



ANALYSE STRUCTURALE DE PROTEINES DE L'ENVELOPPE NUCLEAIRE IMPLIQUEES DANS DES PATHOLOGIES GENETIQUES

S. Caputo

► To cite this version:

S. Caputo. ANALYSE STRUCTURALE DE PROTEINES DE L'ENVELOPPE NUCLEAIRE IMPLIQUEES DANS DES PATHOLOGIES GENETIQUES. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT : . tel-01057110

HAL Id: tel-01057110

<https://theses.hal.science/tel-01057110>

Submitted on 21 Aug 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS VI

Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Ecole doctorale : Interfaces de la Chimie, de la Physique et de l'Informatique avec la Biologie

Présentée par

Sandrine Caputo

**ANALYSE STRUCTURALE DE PROTEINES DE L'ENVELOPPE
NUCLEAIRE IMPLIQUEES DANS DES PATHOLOGIES GENETIQUES**

Soutenue le 6 Octobre 2006, devant le jury composé de :

Professeur	Jean Delettré	Président
Professeur	Christian Roumestand	Rapporteur
Docteur	Jean-Claude Courvalin	Rapporteur
Docteur	Annalisa Pastore	Examinatrice
Docteur	Bernard Gilquin	Directeur de thèse
Docteur	Sophie Zinn-Justin	Responsable de thèse

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay, dans le département d'Ingénierie et d'Etude des Protéines dirigé par le Professeur André Ménez. Je le remercie pour son accueil et pour m'avoir offert l'opportunité de travailler dans ce département.

Merci au Professeur Christian Roumestand et au Docteur Jean-Claude Courvalin qui ont fort aimablement accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Mes remerciements s'adressent également au Professeur Jean Delettre ainsi qu'au Docteur Annalisa Pastore, qui ont pris le temps de lire ce manuscrit et ont accepté de faire partie de mon jury.

Ma thèse a été réalisée sous la direction du Docteur Bernard Gilquin. Un grand merci pour vos conseils, votre confiance, vos encouragements au quotidien, vos discours sur le théâtre et la littérature, ainsi que pour les trajets en voiture. Je pense que des chefs comme vous, on en trouve peu. Peut être qu'un jour, Bernard, je me mettrai enfin au théâtre.

Ma thèse a aussi été encadrée par le Docteur Sophie Zinn-Justin à qui j'aimerais adresser aussi tous mes remerciements. Travailler avec toi m'aura beaucoup appris. Tu m'auras donné pendant ces quatre années l'image du chercheur de qualité. Par ton écoute, ta disponibilité, ta gentillesse, ta patience et ta compréhension tu m'auras appris ce qu'est la recherche.

Je ne peux remercier Sophie sans penser aussi au Docteur Joël Couprie. Merci pour ton humour et ta bonne humeur toujours prêts à remonter le moral. Merci aussi pour ton écoute qui était indispensable à certains moments. Merci d'être comme tu es.

Merci à vous trois, Bernard, Sophie et Joël de m'avoir consacré autant de temps pendant cette thèse et pour tous les conseils que vous m'avez prodigué. Je pense qu'à vous trois vous former une équipe complémentaire sur bien des points, que ce soit pour la recherche mais aussi les collaborations ou la communication. Vous montrez un exemple de ce que devrait être la recherche en général. Trouver un autre laboratoire comme celui-ci sera difficile.

Lors de cette thèse, j'ai eu l'occasion de travailler avec de nombreuses personnes qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires et formée à différentes techniques. Je souhaite remercier tout d'abord Roger Genet, Muriel Gondry et Marie Courçon qui m'ont tout appris sur la production et purification des protéines. Il faut dire que j'ai eu l'occasion de m'entraîner de nombreuses fois. Merci pour votre patience et les réponses à mes nombreuses questions. Je remercie aussi Pascal Belin, Sandrine Braud et Mireille Moutiez pour la biologie moléculaire, Jean-Baptiste Charbonnier pour la purification de protéines et la cristallogénèse,

Enrico Stura pour la cristallogenèse, Loic Martin pour le Biacore et Robert Thai et Steven Dubois pour mes séquençages toujours si urgents. Merci aussi à Michel Toledano et Stéphanie Michelet pour leurs précieux conseils en matière de ponts disulfures.

Un immense merci à Isabelle Duband-Goulet pour les expériences de gel retard avec mes protéines qui ne se comportent pas toujours comme il faudrait. Merci de ces longues discussions, avec nos si, on aurait pu réécrire l'histoire des lamines et des protéines de l'enveloppe d'un bout à l'autre. Je tiens à souligner que dans le cadre de mon sujet, j'ai été largement aidée par Isabelle Krimm et ses fous rires inimitables, Nikolas Friedrich et sa passion du football, Emilie Kondé et récemment par Sylvaine Gasparini qui vient de nous rejoindre. Je ne peux penser à mon sujet sans avoir une pensée pour Howard J. Worman, Feng Lin et Cecilia Östlund, nos collaborateurs à New-York qui nous ont fourni de nombreux plasmides. Merci aussi à une collaboratrice plus proche, Valérie Verstraeten et son enthousiasme parfois surprenant.

Je remercie enfin tous les étudiants et non étudiants du Laboratoire de Structure des Protéines que j'ai pu rencontrer et connaître au cours de cette thèse. Je garderai d'excellents souvenirs de nos fous rires, de nos trajets en RER et de nos soirées parisiennes dans ces petits restos sympas. Merci à tous, Gaelle Charier, Albane Le Maire, Paola Llinas, Marie-Hélène Ledu, Pascale Aliprandi, Nathalie Lancelot, Jean-Nicolas Polonowski, Sophie Lhuillier, Guillaume Letellier, Carine Tellier, Ludovic Carlier, Cédric Laguri et Marianne Axt.

Je n'oublie pas non plus les « non structuralistes », Cédric Masson, Jean Baillon, Ludovic Sauguet, Anthony Caruana, Cécile Clavaud, Aurélie Perrier, et enfin tout le DIEP.

Un dernier merci mais non le moindre à mes amis et ma famille qui m'ont soutenu et permis d'avancer. Merci aussi à Fred pour avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenu dans les meilleurs moments comme dans les pires et aussi simplement pour l'essentiel.

Sommaire

SOMMAIRE	4
SOMMAIRE DES FIGURES	7
ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION GENERALE	12
CHAPITRE 1 : L'ENVELOPPE NUCLEAIRE, STRUCTURE ET FONCTIONS	14
<u>I. LA MEMBRANE NUCLEAIRE EXTERNE EST ESSENTIELLE AU POSITIONNEMENT DU NOYAU. .</u>	<u>15</u>
<u>II. LES PORES NUCLEAIRES ET LE TRANSPORT NUCLEO-CYTOPLASMIQUE</u>	<u>19</u>
1. <u>Structures des pores</u>	19
2. <u>Transport nucléo-cytoplasmique</u>	20
3. <u>Interactions des pores nucléaires avec la lamina</u>	21
<u>III. LES PROTEINES DE LA MEMBRANE NUCLEAIRE INTERNE</u>	<u>22</u>
1. <u>Le LBR</u>	22
2. <u>Les LAPs</u>	24
3. <u>L'émerine</u>	26
4. <u>MAN1</u>	28
<u>IV. LA LAMINA NUCLEAIRE</u>	<u>30</u>
1. <u>Les gènes des lamines</u>	31
2. <u>Le rôle des lamines</u>	33
A. <u>Les lamines déterminent la taille et la forme du noyau</u>	34
a - La forme du noyau.	34
b - La taille du noyau.	35
c - Résistance à la déformation.....	35
B. <u>Association des lamines avec l'ADN et la chromatine</u>	35
C. <u>La dynamique des lamines pendant le cycle cellulaire</u>	36
a - Dynamique en interphase	36
b - Dynamique pendant la mitose	37
3. <u>La structure</u>	39
A. <u>Structure primaire</u>	39
B. <u>La polymérisation des lamines</u>	40
C. <u>Structure tridimensionnelle</u>	41
4. <u>Les modifications post-traductionnelles des lamines</u>	43
5. <u>Les laminopathies</u>	44
A. <u>Les myopathies</u>	44
B. <u>Les lipodystrophies</u>	46
C. <u>Neuropathie périphérique</u>	47
D. <u>Les syndromes de vieillissement prématuré</u>	50
a - Les progéras	50
b - La dysplasie acromandibulaire	52
c - Dermopathie restrictive	52
E. <u>Les mécanismes des laminopathies</u>	53
<u>V. ENVELOPPE NUCLEAIRE ET REGULATION DE LA TRANSCRIPTION</u>	<u>55</u>
1. <u>Les lamines, régulatrices de la transcription</u>	55
A. <u>Lamine, LAP2α et Rb</u>	55
B. <u>Les lamines de type A et SREBP1</u>	56
2. <u>LAP2β sert d'intermédiaire à la répression des gènes</u>	58
3. <u>L'émerine interagit avec des régulateurs de la transcription</u>	58

4. <i>MAN1, les lamines et les R-Smads : rôle de l'enveloppe nucléaire dans la transduction du signal</i>	59
A. <i>Rappels sur les protéines R-Smads</i>	59
B. <i>Lamines et Smads</i>	61
C. <i>MAN1 dans la transduction du signal</i>	62
CHAPITRE 2 : ANALYSE DE LA REGION C-TERMINALE NUCLEOPLASMIQUE DE MAN1 HUMAINE	65
I. <i>INTRODUCTION</i>	65
II. <i>CARACTERISATION STRUCTURALE DE LA REGION C-TERMINALE DE MAN1</i>	67
1. <i>Résultats préliminaires non publiés</i>	67
A. <i>Le premier domaine est replié d'après le Dichroïsme Circulaire</i>	67
B. <i>L'ensemble de la région C-terminale contient un seul domaine structuré</i>	67
2. <i>Articles publiés</i>	69
A. <i>The carboxyl-terminal nucleoplasmic region of MAN1 exhibits a DNA binding winged helix domain</i>	69
B. <i>Lettre to the Editor: ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the region 655-775 of human MAN1</i>	79
3. <i>Résultats complémentaires non publiés</i>	82
A. <i>La conservation en séquence de la région C-terminale de MAN1</i>	82
B. <i>Modélisation du domaine UHM</i>	84
C. <i>Essais de cristallogénèse</i>	85
D. <i>Modélisation du complexe MAN1/R-Smads</i>	85
E. <i>Essais de production et de purification du domaine MH2 de Smad3</i>	87
CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DES INTERACTIONS DE LA LAMINE A/C ET SES PARTENAIRES	89
I. <i>INTRODUCTION</i>	89
II. <i>INTERACTION DE LA PARTIE « QUEUE » DES LAMINES A/C AVEC SES PARTENAIRES</i>	90
1. <i>Analyse de séquence du domaine de type immunoglobuline</i>	90
2. <i>Caractérisation structurale en solution de la partie « queue »</i>	92
3. <i>Analyse de l'interaction entre la lamine de type A et l'émerine</i>	95
A. <i>Mise au point des conditions d'expression de l'émerine 1-187</i>	95
a - <i>Les constructions issues de la plate-forme</i>	96
b - <i>La construction TEV#1</i>	97
B. <i>Caractérisation structurale de l'émerine : étude par RMN</i>	99
C. <i>Interaction émerine-lamine par pulldown</i>	101
4. <i>Analyse de l'interaction entre la lamine de type A et SREBP1</i>	101
A. <i>Interaction in vitro par pulldown</i>	102
B. <i>Cartographie de l'interaction lamine/SREBP1</i>	103
III. <i>CARACTERISATION D'UN MUTANT DES LAMINES DE TYPE A : R439C</i>	106
1. <i>Article: The FPLD-associated R439C LMNA mutation causes lamin oligomerisation that interferes with DNA binding (submitted to Human Mutation)</i>	106
2. <i>En cours : à la recherche des ponts disulfures de la lamine in vivo</i>	134
CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	136
I. <i>MAN1, PROTEINE REGULATRICE OU INHIBITRICE DE LA TRANSCRIPTION</i>	136
II. <i>LA LAMINE ET SES PARTENAIRES</i>	138
CHAPITRE 5 : MATERIELS ET METHODES	143
I. <i>EXPRESSION, PRODUCTION ET PURIFICATION</i>	143
1. <i>La plate-forme de production de protéines recombinantes chez E. coli du DIEP</i>	143
2. <i>Les différentes constructions de la région C-terminale de MAN1</i>	144

A. <i>MANIC^A</i>	144
B. <i>MANI-UHM</i>	145
C. <i>MANIC^B</i>	145
3. <i>Le domaine MH2 de Smad3</i>	145
4. <i>Lamine A/C</i>	146
A. <i>Les protéines recombinantes</i>	146
B. <i>La protéine entière</i>	147
5. <i>L'Emerine</i>	147
A. <i>Souches de E. coli utilisées pour l'expression de l'émerine 1-187</i>	148
B. <i>Co-expression de l'émerine avec des protéines chaperons</i>	148
C. <i>Renaturation de l'émerine produite en corps d'inclusion</i>	148
D. <i>Production de l'émerine à partir du plasmide TEV#1</i>	149
6. <i>SREBP1</i>	149
II. <i>CARACTERISATION STRUCTURALE</i>	149
1. <i>Caractérisation par Dichroïsme Circulaire (DC)</i>	149
2. <i>Préparation des échantillons pour la RMN</i>	150
3. <i>Expériences RMN et modélisation</i>	150
III. <i>INTERACTIONS</i>	150
1. <i>GST pulldown</i>	150
2. <i>Cartographie de surfaces d'interaction par RMN</i>	150
REFERENCES	152

Sommaire des figures

<i>Figure 1 : Représentation schématique de l'enveloppe nucléaire.</i>	12
<i>Figure 2 : Représentation schématique de l'enveloppe nucléaire et de ses différents composants.</i>	14
<i>Figure 3 : Architecture des principales isoformes des gènes nesprine-1 et nesprine-2.</i>	16
<i>Figure 4 : Modèle des fonctions potentielles des Nesprines.</i>	17
<i>Figure 5 : Modèles de fonctions des protéines à domaine KASH.</i>	18
<i>Figure 6 : Schéma d'un complexe des pores nucléaires de vertébré.</i>	19
<i>Figure 7 : Modèle de transport nucléo-cytoplasmique par les karyophérines au travers des pores nucléaires.</i>	21
<i>Figure 8 : Représentation des interactions du LBR.</i>	23
<i>Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation structurale des protéines de la famille LAP2.</i>	25
<i>Figure 10 : Représentation de la structure tridimensionnelle du domaine LEM de LAP2.</i>	26
<i>Figure 12 : LEM2 est un nouveau membre de la famille des protéines à domaine LEM et de la sous-famille de MAN1.</i>	29
<i>Figure 13 : Organisation des filaments de la lamina nucléaire à la membrane nucléaire interne.</i>	31
<i>Figure 14 : Description des interactions impliquant les lamines, ainsi que des fonctions biologiques des complexes dépendants de la lamine.</i>	33
<i>Figure 15 : Les étapes du cycle cellulaire : la mitose.</i>	37
<i>Figure 16 : Séries d'images confocales (a-c) et des contrastes correspondants (d-f) de cellules PAM vivantes exprimant la GFP-lamine A, de la fin de la télophase au début de la phase G1.</i>	38
<i>Figure 17 : Structure générale des protéines des filaments intermédiaires cytoplasmiques comparés aux lamines.</i>	39
<i>Figure 18 : Représentation schématique de l'organisation des lamines.</i>	40
<i>Figure 19 : Etapes de l'assemblage in vitro des lamines A/C observé en microscopie électronique.</i>	41
<i>Figure 20 : Représentation schématique de l'hétérodimérisation des lamines de type A et B.</i>	41
<i>Figure 21 : Schéma représentant les interactions électrostatiques des parties N-terminale et C-terminale qui recouvrent les dimères de lamines.</i>	42
<i>Figure 22 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la région 411-553 des lamines A/C humaines.</i>	43
<i>Figure 23 : Les mutations dans les lamines peuvent détériorer la plasticité ou le potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) ou des cellules précurseurs dans les tissus spécifiques dérivées des MSCs, conduisant à des phénotypes limités aux tissus.</i>	44
<i>Figure 24 : Localisation des mutations causant des pathologies caractérisées par des anomalies des muscles cardiaque et squelettique.</i>	46
<i>Figure 25 : Localisation des mutations causant une FPLD.</i>	47
<i>Figure 26 : Diagramme schématique de la prélamine A montrant la nature et la localisation des mutants provoquant des pathologies.</i>	49
<i>Figure 27 : Localisation des mutations causant des syndromes progéroïdes. En orange, les mutations à l'origine de la progéria.</i>	51
<i>Figure 28 : Architecture de Rb.</i>	55
<i>Figure 29 : A) Représentation schématique de la région N-terminale de SREBP1a qui rentre dans le noyau. B) Structure tridimensionnelle du dimère du motif bHLH-Zip de SREBP1 avec l'une de ses séquences d'ADN cibles.</i>	57
<i>Figure 30 : Représentation schématique de la voie de signalisation de TGF-β.</i>	59

Figure 31 : Représentation schématique des domaines fonctionnels des protéines Smads.....	61
Figure 32 : MAN1 réprime la voie de signalisation de Bmp4 dans les embryons de <i>Xenopus laevis</i>	62
Figure 32 : Schémas récapitulatifs A- des rôles biologiques des différentes régions de MAN1, B- des constructions étudiées dans ce travail.	65
Figure 34 : Spectre enregistré en dichroïsme circulaire de MAN1C ^A	67
Figure 35 : Spectre 1D ¹ H RMN de MAN1C ^A (en rouge) et MAN1C ^B (en bleu) enregistrés à 23°C à 600 Mhz.....	68
Figure 36 : Spectre 1D ¹ H RMN de MAN1C ^B enregistrés à différentes températures à 600 Mhz.....	68
Figure 37 : Schéma de MAN1C ^B avec les détails topologiques de MAN1C ^A et les différentes interactions connues.....	69
Figure 38 : Alignement de la région C-terminale de MAN1 et LEM2 de toutes les séquences connues des résidus 655 à 775.....	83
Figure 39 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la région 655-775 de MAN1.....	84
Figure 40 : Modèle du domaine UHM de MAN1 réalisé à partir d'un alignement de la littérature.....	85
Figure 41 : Modèle du complexe entre la région C-terminale de MAN1 et le domaine MH2 de Smad2.....	86
Figure 42 : Schéma représentant la lamine A/C,.....	Erreur ! Signet non défini. 89
Figure 43 : Alignement du domaine Ig fold de la région C-terminale des lamines de type A et B.	91
Figure 44 : La représentation de la structure tridimensionnelle du domaine globulaire des lamines révèle une surface chargée positivement hautement conservée dans les lamines de type A et B	92
Figure 45 : Impact des 93 résidus C-terminaux de la lamine A mature.....	93
Figure 46 : Ensemble des variations des déplacements chimiques des résidus 411-553 de la lamine 411-646 par rapport aux résidus de la lamine 411-553.	94
Figure 47 : Surface d'interaction entre le domaine globulaire 411-553 et les résidus 554-646 de la lamine 411-646.....	95
Figure 48 : Schéma représentant l'émerine et le fragment utilisé dans nos études	95
Figure 49 : Gel représentant la co-expression de l'émerine avec les protéines chaperons et la purification de cet essai.	96
Figure 50 : Gel représentant le culot après la concentration de l'émerine à la fin de l'extraction à partir des corps d'inclusion.....	97
Figure 51 : Schéma des deux constructions d'Emerine-Lamine réalisées par notre collaboratrice, Cecilia Ostlund à Columbia University (New York).	98
Figure 52 : A) Gel représentant les différentes étapes de d'expression et de purification de l'émerine à partir de la construction TEV#1. B) Chromatogramme de la filtration sur gel représentant la séparation de l'émerine de la lamine.....	98
Figure 53 : ¹ H- ¹⁵ N HSQC de l'émerine enregistrées à 600MHz et à 25°C.....	99
Figure 54 : Superposition du spectre ¹ H- ¹⁵ N HSQC et du spectre de nOes hétéronucléaires ¹ H- ¹⁵ N de l'émerine enregistrées à 600MHz et à 25°C.	100
Figure 55 : Gels du GST pulldown entre différents fragments de lamine et l'émerine.	101
Figure 56 : Gels du GST pulldown entre différents fragments de lamine et SREBP1 avec 200 mM de NaCl. Ces expériences ont été analysées sur gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes, révélés au bleu de Coomassie.	102
Figure 57 : Gels du GST pulldown entre la lamine A mature ou la prélamine A et SREBP1 avec 100 mM ou 200 mM de NaCl.....	103
Figure 58 : Interaction de la lamine 411-646 avec SREBP1.....	104

<i>Figure 59 : Ensemble des variations des déplacements chimiques des résidus 411-553 de la lamine 411-646 après addition de 2 équivalents de SREBP1.....</i>	<i>104</i>
<i>Figure 60 : Description de l'expérience de blocage des ponts disulfures par NEM.....</i>	<i>134</i>
<i>Figure 61 : Blot des expériences réalisées sur des lamine extraites à partir de cellules HeLa ou de fibroblastes de malades avec la mutation R439C sur les lamine de type A.</i>	<i>134</i>
<i>Figure 62 : Blots des expériences réalisées sur des lamine extraites à partir de fibroblastes sains ou de fibroblastes de malades avec la mutation R439C sur les lamine de type A..</i>	<i>135</i>
<i>Figure 63 : Représentation d'un modèle pour la reconnaissance et la régulation de gènes spécifiques par les protéines Smads en concert avec MAN1.</i>	<i>137</i>
<i>Figure 64 : Représentation des constructions issues de la plateforme de production de protéines recombinantes chez E. coli du DIEP.</i>	<i>137</i>
<i>Figure 65 : Schéma représentant les fragments de lamine A ou C utilisés dans nos études.</i>	<i>146</i>

Abréviations

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
BAF :	Barrier-to-Autointegration Factor
Cdc6 :	Cell-Division-Cycle protein 6
DTT :	DiThioThreitol
EDTA :	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
FLIP :	Fluorescence Loss of Intensity after Photobleaching
FRAP :	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET :	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GAP :	GTPase Activating Protein
GCL :	Germ-Cell Less
GDP :	Guanosine Diphosphate
GFP :	Green Fluorescence Protein
GS4B :	Glutathione Sepharose 4B
GST :	Glutathione Sepharose Transférase
GTP :	Guanosine Triphosphate
HIV :	Human Immunodeficiency Virus
HP1 :	Heterochromatin protein 1
IPTG:	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
KASH :	Klarsicht, Anc-1, Syne-1 Homology
LAP :	Lamina-associated polypeptide
LEM :	L AP2, E merine, M AN1
NEM :	N-Ethylmaleimide
NES :	Nuclear Export Signal
NLS :	Nuclear Localisation Signal
NPC :	Nuclear Pore Complex
Nup :	Nucléopore
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PEG :	Poly Ethylène Glycol
PMSF :	PhénylMéthylSulfonyl Fluoride

Rb :	protéine du Rétinoblaste
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RNAi :	ARN interférence
RRM :	RNA Recognition Motif
SDS-PAGE :	Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
SREBP1 :	Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1
TCEP :	Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
TEV :	Tobacco Etch Virus
TGF- β :	Transforming Growth Factor- β
TSP :	3-(triméthylsilyl)[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$] propionate
UHM :	U2AF Homology Motif
WH :	Winged Helix

Introduction générale

Le noyau est un organe présent dans les cellules eucaryotes et contenant la plupart du matériel génétique de la cellule. Il a deux fonctions principales : contrôler les réactions chimiques du cytoplasme et stocker les informations nécessaires à la division cellulaire. Il a un diamètre variant de 10 à 20 micromètres ce qui fait de lui le plus grand des organites.

Le noyau des cellules eucaryotes est entouré par une enveloppe qui sépare l'intérieur du noyau du cytoplasme (figure 1). Cette enveloppe est composée (1) des membranes nucléaires interne et externe qui fusionnent à intervalle régulier, formant les pores nucléaires, (2) des complexes protéiques des pores nucléaires et (3) de la lamina nucléaire. Elle permet d'isoler les réactions chimiques se déroulant dans le cytoplasme de celles se déroulant à l'intérieur du noyau. Elle est initialement devenue un sujet d'étude important à cause du rôle des pores nucléaires dans le transport entre le cytoplasme et le noyau : les composants des complexes des pores nucléaires ont été identifiés, les détails mécanistiques du transport cytoplasme/noyau ont été élucidés.

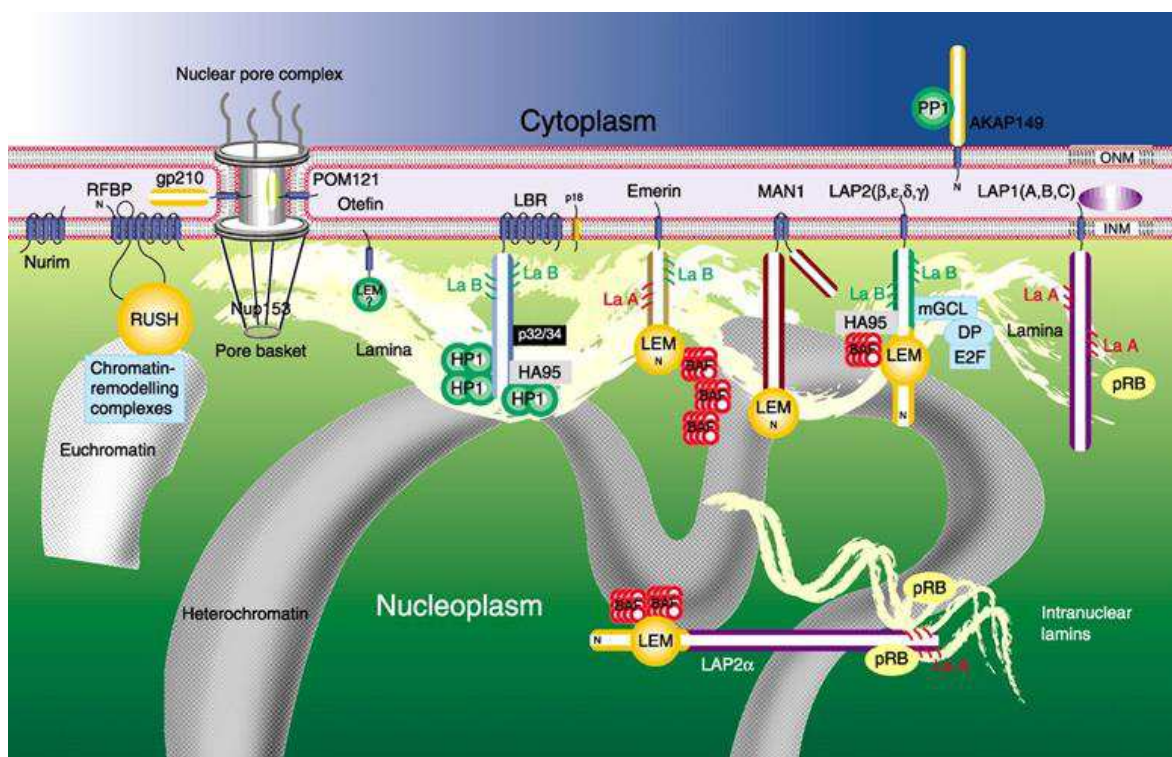


Figure 1 : Représentation schématique de l'enveloppe nucléaire (Foisner, 2001).

Plus récemment, il a été découvert que des mutations dans plusieurs protéines de l'enveloppe nucléaire sont responsables de graves maladies héréditaires (Somech et al., 2005). L'analyse de l'effet de ces mutations a permis de préciser le rôle de l'enveloppe nucléaire dans la structuration du noyau, et de proposer des rôles nouveaux pour les protéines de l'enveloppe dans l'organisation de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes (Bengtsson and Wilson, 2004; Gruenbaum et al., 2005; Worman, 2006). Les tissus affectés par les mutations pathologiques étant très variés selon la mutation incriminée, et certaines protéines de l'enveloppe nucléaire étant spécifiques des tissus en voie de différenciation, il a été suggéré que la lamina nucléaire jouait le rôle de plate-forme pour le recrutement de facteurs nécessaires à la différenciation des cellules, en particulier dans les muscles et les tissus adipeux (Gotzmann and Foisner, 2006). Enfin, la découverte que certaines maladies caractérisées par un vieillissement extrêmement prématuré étaient provoquées par une mutation dans le gène de l'un des composants principaux de la lamina a provoqué une réflexion sur les rôles respectifs de l'enveloppe nucléaire et de la machinerie de réparation des dommages de l'ADN dans les phénomènes de vieillissement (Lans and Hoeijmakers, 2006). En particulier, Scaffidi et Misteli ont observé que les mécanismes moléculaires à l'origine de la progéria de Hutchinson-Gilford, une pathologie sévère du vieillissement, ont lieu bien qu'à un plus faible niveau dans les cellules âgées saines (Scaffidi and Misteli, 2006). Le fait que le vieillissement chez un patient atteint de la progéria et chez un sujet âgé et sain partagent une base cellulaire et moléculaire commune suggère que la lamine A participe au processus de vieillissement normal.

Dans ce cadre, le laboratoire a entrepris la caractérisation de la structure tridimensionnelle à l'échelle atomique des protéines de l'enveloppe nucléaire. Mon objectif a été de me concentrer sur l'étude de trois protéines impliquées dans des maladies héréditaires, la lamine A/C, l'émerine et MAN1, afin d'établir un lien entre leur structure tridimensionnelle et les mécanismes fonctionnels déficients dans les pathologies associées. Afin d'éclairer l'apport de nos études structurales, je ferai tout d'abord le point sur l'état des connaissances sur l'enveloppe nucléaire et les protéines qui la composent. Puis je présenterai mes travaux sur MAN1, ainsi que les deux articles associés. Enfin, je détaillerai l'avancée de mes travaux sur la lamine A/C avec SREBP1, et je joindrai l'article sur l'analyse clinique et moléculaire du mutant R439C de la lamine A/C.

Chapitre 1 : L'enveloppe nucléaire, structure et fonctions

L'enveloppe nucléaire est composée des membranes nucléaires, des complexes des pores nucléaires et de la lamina nucléaire (figure 2). Les membranes nucléaires sont divisées en trois domaines morphologiquement distincts mais interconnectés : externe, interne et pore. Les membranes des pores connectent les membranes externe et interne en de nombreux points. Elles contiennent des protéines intégrées uniques, telles que gp210 et POM121 dans les mammifères et POM152 dans les levures, lesquelles appartiennent aux complexes des pores nucléaires. Ceux-ci sont constitués d'environ une cinquantaine de protéines de types différents appelées nucléoporines (Cronshaw et al., 2002; Rout et al., 2000). La structure des complexes des pores nucléaires, leurs compositions protéiques ainsi que leurs rôles dans le transport nucléo-cytoplasmique ont été le sujet de plusieurs revues récentes (Bednenko et al., 2003; Cronshaw and Matunis, 2003; Fahrenkrog and Aebi, 2003; Rabut et al., 2004; Suntharalingam and Wentz, 2003).

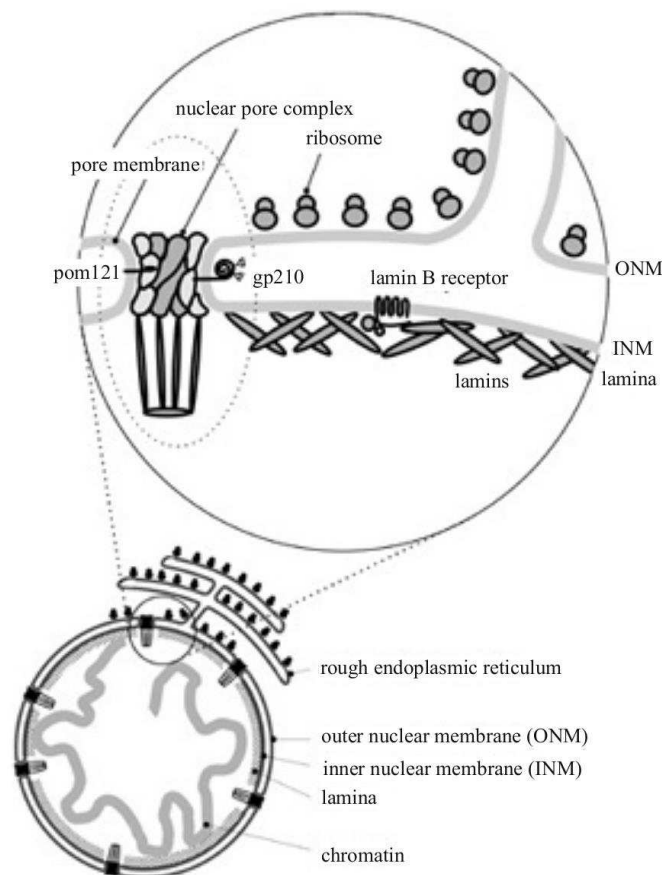


Figure 2 : Représentation schématique de l'enveloppe nucléaire et de ses différents composants.

Dans ce chapitre, je décrirai tout d'abord les protéines de la membrane nucléaire externe et leurs interactions avec les réseaux de protéines impliquées dans l'organisation du cytoplasme. Puis je montrerai comment les complexes des pores nucléaires régulent le transport nucléo-cytoplasmique. Je présenterai ensuite les protéines de la membrane nucléaire interne et la lamina, responsables des interactions entre l'enveloppe nucléaire et la chromatine. Enfin, je détaillerai les découvertes récentes sur le rôle de ces protéines dans la régulation de l'expression des gènes.

I. La membrane nucléaire externe est essentielle au positionnement du noyau.

La membrane nucléaire externe contient des ribosomes sur sa surface cytoplasmique. Elle a longtemps été admise comme identique, en composition protéique, à la membrane du réticulum endoplasmique rugueux, avec lequel elle est en continuité. Cependant, des données récentes suggèrent que la membrane nucléaire externe contient l'intégralité des protéines impliquées dans le positionnement nucléaire qui ne sont pas présentes au niveau du réticulum endoplasmique (Starr and Han, 2003).

Parmi ces protéines, nous trouvons les produits de deux gènes, nesprine 1 et nesprine 2 (aussi appelées syne-1 et syne-2 ou encore Nuance ou Myne1 ou ENAPTIN ou ANC-1), qui codent pour des polypeptides contenant des répétitions de séquences de type spectrine (Young and Kothary, 2005; Zhang et al., 2001). Ces répétitions ont tout d'abord été identifiées au sein de grandes protéines, les mieux caractérisées étant des protéines cytoplasmiques comme la dystrophine et l' α -actinine. La structure générale de ces protéines est : un domaine central contenant les répétitions impliquées dans l'auto-association de la protéine, une région N-terminale liant l'actine composée de deux domaines homologues à la calponine et une région C-terminale contenant un domaine fonctionnel distinct. Les régions C-terminales interviennent dans des activités telles que l'association aux membranes, la liaison aux filaments intermédiaires et aux microtubules. Dans le cas des nesprines, une initiation alternative de la transcription ainsi qu'un épissage alternatif de l'ARN génèrent de multiples isoformes avec des poids moléculaires qui s'étendent approximativement de 50 kDa (Nesprine- α 2) à 800 kDa (Nuance). Certaines isoformes de nesprines n'ont pas de région C-terminale. D'autres isoformes ont comme région C-terminale un domaine KASH (pour Klarsicht, Anc-1, Syne-1 Homology ou « Klarsicht-like domain », figure 3), constitué d'un passage transmembranaire suivi d'un segment de 35 résidus riche en proline.

Les nesprines peuvent diffuser latéralement dans la membrane du réticulum endoplasmique, mais alors que les petites isoformes sont capables d'atteindre la membrane nucléaire interne, les grandes isoformes sont exclues de cette membrane, probablement à cause de la taille restreinte des canaux des complexes des pores nucléaires (Soullam and Worman, 1995).



Figure 3 : Architecture des principales isoformes des gènes nesprine-1 et nesprine-2 (Warren et al., 2005) . L'astérisque repère les isoformes spécifiques du muscle (CH domain : domaine analogue à la calponine ; SR-like rod domain : répétition de type spectrine ; Klarsicht-like domain : domaine analogue à la protéine Klarsicht).

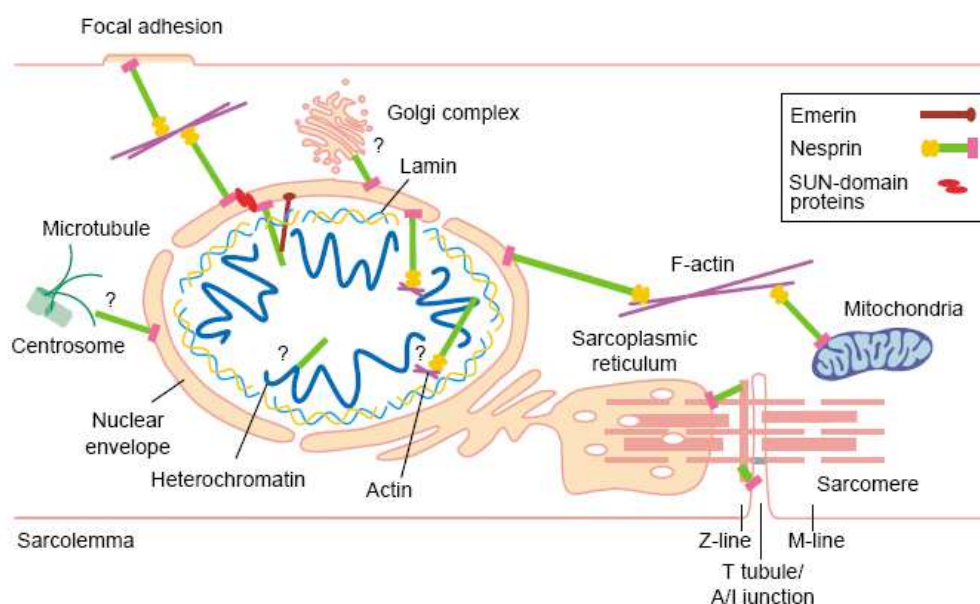


Figure 4 : Modèle des fonctions potentielles des Nesprines (Warren et al., 2005). Cette représentation montre les localisations subcellulaires et les connexions potentielles formées par les différentes isoformes des Nesprines dans toute la cellule du muscle squelettique. Les Nesprines forment un réseau qui relie la membrane plasmique au noyau.

Les grandes isoformes de nesprine interagissent par leur domaine N-terminal avec le cytosquelette d'actine (figure 4) (Zhang et al., 2002). De plus, elles s'attachent par leur domaine C-terminal KASH aux domaines périnucléaires SUN des protéines de la membrane nucléaire interne telles que UNC84 (Lee et al., 2002b; Malone et al., 1999) et Matefin chez *Caenorhabditis elegans* et SUN1 et SUN2 (Hodzic et al., 2004) chez les mammifères. Un exemple en est la protéine ANC-1 de *C. elegans* contenant une répétition de séquences de type spectrine et un domaine périnucléaire qui interagit directement ou indirectement avec le domaine périnucléaire SUN de UNC84 (Starr and Han, 2002). Les plus petites isoformes s'associent dans le noyau avec l'émerine et les lamines A/C (Zhang et al., 2005). Enfin, certaines isoformes s'ancrent, de part leur segment transmembranaire, à la membrane d'organites autre que le noyau, comme le réticulum endoplasmique ou la mitochondrie (Starr and Han, 2002).

D'autres protéines localisées à la membrane nucléaire externe contiennent un domaine KASH (Starr and Fischer, 2005). Ces domaines KASH s'associent aux domaines SUN des protéines de la membrane nucléaire interne et ancrent ainsi les protéines qui les possèdent à la membrane nucléaire externe (figure 5).

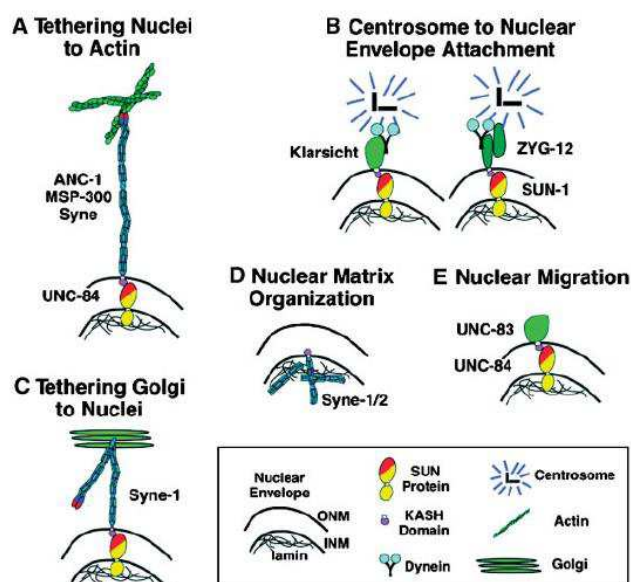


Figure 5 : Modèles de fonctions des protéines à domaine KASH (Starr and Fischer, 2005). **A** : La famille des ANC-1/MSP-300/Syne relie le noyau au cytosquelette d'actine. **B** : Klarsicht et ZYG-12 attachent les centrosomes à l'enveloppe nucléaire. **C**, **D** : Différentes isoformes de Syne positionnent le Golgi (**C**) et organisent la matrice nucléaire (**D**). **E** : UNC-83 est impliqué, par un mécanisme encore inconnu, dans la migration nucléaire. Les protéines SUN, incluant UNC-84 et SUN-1, recrutent les protéines à domaine KASH à l'enveloppe nucléaire. ONM : Membrane Nucléaire Externe ; INM : Membrane Nucléaire Interne.

Les protéines à domaine KASH ont tout d'abord été identifiées chez *Drosophila* et *C. elegans*. En effet, des mutations au sein de ces protéines provoquaient un positionnement anormal du noyau. Plus récemment, les protéines à domaine KASH ont été montrées impliquées dans l'attachement du centrosome au noyau, la migration nucléaire et l'amarrage du noyau au cytosquelette d'actine.

Comme pour la membrane nucléaire externe, l'espace périnucléaire entre les membranes nucléaires externe et interne a longtemps été considéré identique à la lumière du réticulum endoplasmique. On pourrait cependant imaginer que la composition de l'espace périnucléaire diffère du lumen de la plus grande partie du réticulum endoplasmique. Puisque des parties des protéines localisées et intégrées aux membranes, interne et des pores, dans la région luminale pourraient lier des protéines ne résidant pas à la membrane. En effet, des données récentes démontrent que des mutations au sein de la torsine A, une protéine luminale du réticulum endoplasmique impliquée dans la dystonia DYT1, provoquent la concentration de la protéine dans l'espace périnucléaire par liaison au domaine luminal de LAP1 (lamina associated polypeptide 1) (Goodchild and Dauer, 2005). Désormais, la membrane nucléaire externe et l'espace périnucléaire apparaissent comme des sous-domaines différenciés de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux et du lumen.

II. Les pores nucléaires et le transport nucléo-cytoplasmique

1. Structures des pores

L'enveloppe nucléaire des cellules eucaryotes est perforée à intervalles réguliers par de volumineux complexes multiprotéiques, les pores nucléaires ou NPCs (Nuclear Pore Complexes). Ces complexes sont formés d'environ une cinquantaine de protéines différentes appelées les nucléoporines (Nup) (Cronshaw et al., 2002; Rout et al., 2000). Le nombre de pores nucléaires dépend de l'état fonctionnel de la cellule, il varie de 4000 à 6000 dans une cellule de mammifère.

Un pore nucléaire apparaît à la surface des membranes comme un anneau d'une centaine de nanomètres de diamètre par microscopie électronique. Il comporte en fait deux anneaux, l'un cytoplasmique et l'autre nucléoplasmique, présentant chacun une architecture symétrique d'ordre huit (figure 6). Ces deux anneaux sont reliés par des rayons issus de chacune des huit sous-unités, l'ensemble formant une cage cylindrique (Suntharalingam and Wentz, 2003).

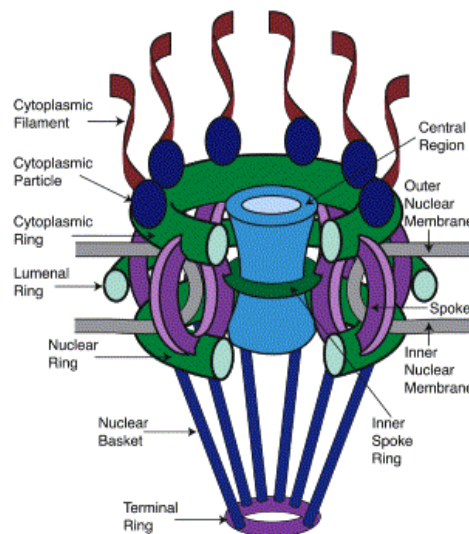


Figure 6 : Schéma d'un complexe des pores nucléaires de vertébré (Suntharalingam and Wentz, 2003).

Les sous-unités de l'anneau cytoplasmique émettent dans le cytoplasme huit fibrilles. Les sous-unités de l'anneau nucléaire émettent huit autres filaments plus longs qui se fixent sur un anneau distal de plus faible diamètre, formant un « panier ou cage nucléaire ». La région centrale du pore est localisée au centre de la cage cylindrique à laquelle elle est reliée par un anneau interne. L'ensemble de ces éléments est encastré dans l'enveloppe nucléaire à l'intérieur d'un anneau luminal et est stabilisé par des interactions avec différents types de protéines membranaires ainsi qu'avec les filaments intermédiaires du noyau. Les

nucléoporines sont localisées dans les sous-unités des anneaux et sur les fibrilles et filaments. Elles interviennent dans la reconnaissance et le guidage des molécules transitant à travers les NPCs.

2. Transport nucléo-cytoplasmique

Les pores nucléaires sont perméables aux petites molécules (tels les ions et les nucléotides) d'un poids moléculaire inférieur à 5 kDa qui diffusent passivement. Les molécules d'un poids moléculaire de 5 à 50 kDa diffusent à une vitesse proportionnelle à leur taille (diffusion facilitée). Les molécules d'un poids moléculaire supérieur à 50 kDa (tels que les sous-unités des ribosomes, les ARN, ou les composants du réplisome) sont transportées par un mécanisme actif et sélectif. Par exemple, dans une cellule de mammifère en prolifération, un million de molécules par minute transitent à travers les NPCs.

La prise en charge des protéines et des ARN, parfois sous forme de ribonucléoprotéines, par une molécule transporteur dépend de la présence de séquences d'importation nucléaire appelées Signal de Localisation Nucléaire (NLS : Nuclear Localisation Signal) formées de 4 à 8 acides aminés basiques. Ces séquences peuvent être organisées en deux blocs séparés par une dizaine d'acides aminés. Elles peuvent être activées et inactivées par phosphorylation et déphosphorylation. L'exportation dépend de la même façon de séquences signal appelées Signal d'Exportation Nucléaire (NES : Nuclear Export Signal). Suite à la formation des complexes entre transporteurs et molécules « cargo » (à transporter), il y a interaction entre ces complexes et les nucléoporines (figure 7). La vectorisation du transport (noyau vers cytoplasme ou inversement) dépend tout d'abord de la distribution asymétrique des différents types de nucléoporines sur les faces nucléaire et cytoplasmique du pore.

Les karyophérines (Kap) sont une famille de transporteurs qui reconnaissent des séquences NLS ou NES spécifiques : les importines assurent le transfert du cytoplasme dans le noyau, et les exportines exercent la fonction inverse. Plus d'une vingtaine de ces transporteurs ont été identifiés dans les cellules humaines. Ces molécules fixent par leur domaine C-terminal la molécule « cargo », et par leur domaine N-terminal la protéine Ran-GTP/GDP qui joue un rôle clef dans l'adressage nucléaire ou cytoplasmique du « cargo ». La molécule Ran appartient à la famille des petites protéines G à fonction GTPase, capables d'hydrolyser le GTP en GDP. Le sens du transfert dépend du gradient de concentration des Ran-GTP/Ran-GDP et de l'affinité différentielle des exportines et importines pour ces deux conformations. Le recyclage de Ran est essentiel au maintien de ces deux formes entre noyau et cytoplasme.

- Les importines fixent leur cargo dans le cytoplasme selon un mécanisme qui dépend de Ran-GDP. Après transfert dans le noyau, elles le libèrent après conversion de la conformation Ran-GDP en Ran-GTP par l'action d'une enzyme de phosphorylation (RCC1).
- Les exportines, au contraire fixent leur cargo dans le noyau sous l'effet de Ran-GTP. Après transit à travers les pores nucléaires, elles le libèrent suite à l'activation de l'activité GTPase de Ran qui convertit Ran-GTP en Ran-GDP. Dans le cytoplasme, cette activité GTPasique est induite par un activateur appelé GAP (GTPase Activating Protein) localisé sur la face cytoplasmique du pore.

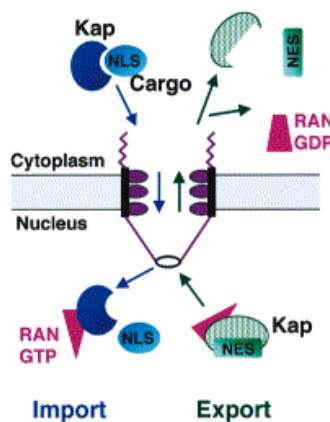


Figure 7: Modèle de transport nucléo-cytoplasmique par les karyophérines au travers des pores nucléaires (Suntharalingam and Wenté, 2003).

Enfin, d'autres familles de transporteurs ont été identifiées. En particulier, l'exportation des ARNm est réalisée par des transporteurs non karyophérines (Reed and Hurt, 2002).

3. Interactions des pores nucléaires avec la lamina

Dans les cellules de vertébrés, des études ont été menées sur la stabilité du réseau formé par les pores nucléaires (Suntharalingam and Wenté, 2003). Une fois assemblés, les NPCs se présentent comme immobiles en interphase, dans le plan de l'enveloppe nucléaire (Daigle et al., 2001). Un postulat a été émis selon lequel les lamines associées à la membrane nucléaire interne serviraient d'ancre aux NPCs dans l'architecture intranucléaire. Cette hypothèse a été étayée par les études dans *S. cerevisiae* où il n'y a pas de lamina nucléaire. Ces études indiquent que la mobilité latérale des NPCs dans les levures est plus importante (Belgareh and Doye, 1997; Bucci and Wenté, 1997). De même, chez la drosophile, en

l'absence de lamina sauvage, les NPCs se regroupent en foyer sur l'enveloppe nucléaire (Lenz-Bohme et al., 1997). Il a aussi été montré que les nucléoporines Nup153 et Nup53 interagissent avec les lamines et qu'elles pourraient ainsi participer à l'ancrage des pores dans la lamina (Hawryluk-Gara et al., 2005; Smythe et al., 2000).

III. Les protéines de la membrane nucléaire interne

Une analyse protéomique a suggéré qu'au moins 80 protéines sont localisées au niveau de la membrane nucléaire interne dans les cellules interphasiques de mammifères (Schirmer et al., 2003). Aujourd'hui, seulement une douzaine de ces protéines a été caractérisée en détail. Beaucoup de protéines intégrées à la membrane nucléaire interne ont leur domaine N-terminal du côté nucléoplasmique et un ou plusieurs segments transmembranaires. Ces protéines sont synthétisées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux et diffusent latéralement pour atteindre la membrane nucléaire interne, où elles interagissent avec la lamina et/ou la chromatine (Ellenberg et al., 1997; Ostlund et al., 1999; Soullam and Worman, 1993; Soullam and Worman, 1995; Wu et al., 2002). Des contraintes de taille imposées par les canaux latéraux des complexes des pores nucléaires paraissent restreindre l'accès à la membrane nucléaire interne des protéines possédant des domaines nucléoplasmiques de plus de 60 kDa (Soullam and Worman, 1995; Wu et al., 2002).

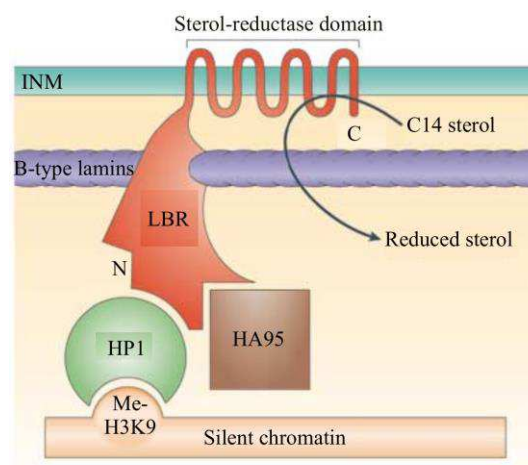
Pendant la mitose, les protéines de la membrane nucléaire interne se dissocient de la lamina et de la chromatine et sont dispersées dans le réticulum endoplasmique résiduel; elles diffusent dans la structure de la membrane après la décondensation de la chromatine pour reformer les enveloppes nucléaires des cellules filles (Ellenberg et al., 1997; Yang et al., 1997). Comme les lamines, les protéines de la membrane nucléaire interne sont phosphorylées sur des sites spécifiques lors du désassemblage mitotique de l'enveloppe nucléaire (Courvalin et al., 1992; Ellis et al., 1998; Foisner and Gerace, 1993). De plus, plusieurs protéines de la membrane nucléaire interne interviennent dans la décondensation « précoce » de la chromatine lors du réassemblage nucléaire préalable à l'assemblage de la lamina. Ceci se fait à travers les interactions de ces protéines avec les composants de la chromatine (Buendia and Courvalin, 1997; Chaudhary and Courvalin, 1993; Haraguchi et al., 2000).

1. Le LBR

Le LBR (lamin B receptor) est le premier gène codant pour une protéine de la membrane nucléaire interne à avoir été identifié (Worman et al., 1988). Il contient 13 exons et

est localisé sur le chromosome 1q42.1 (Schuler et al., 1994; Wydner et al., 1996). Des mutations dans ce gène sont à l'origine de deux maladies, une maladie autosomique dominante de la lignée granulocytaire (syndrome de Pelger-Huët) et une dysplasie squelettique Greenberg/HEM avec mort fœtale *in utero* (Hoffmann et al., 2002; Waterham et al., 2003).

LBR est une protéine de 615 acides aminés qui comporte une région N-terminale nucléoplasmique de 200 acides aminés, suivie de huit segments transmembranaires (Worman et al., 1990; Ye and Worman, 1994). La région nucléoplasmique contient un domaine prédit de type Tudor, semblable à celui retrouvé dans plusieurs protéines liant des peptides méthylés, puis une région pauvre en acides aminés hydrophobes et enfin un deuxième domaine prédit comme globulaire (Ye and Worman, 1996). Elle interagit avec les lamines de type B lorsqu'elle se trouve sous forme de fusion GST accrochée à des billes présentant du glutathion (Worman et al., 1988; Ye and Worman, 1994). Sa séquence riche en Ser, Gly, Arg et pauvre en acides aminés hydrophobes, est nécessaire à la liaison de LBR avec l'ADN double brin *in vitro* (Duband-Goulet and Courvalin, 2000; Ye and Worman, 1994). La phosphorylation de cette région par de multiples kinases permet de réguler l'interaction entre LBR et la chromatine au cours du cycle cellulaire (Takano et al., 2002). Les trente premiers résidus de la deuxième région prédite comme globulaire sont indispensables à la liaison de LBR avec la protéine de l'hétérochromatine HP1, lorsque cette liaison est observée par GST pulldown et double-hybride (figure 8) (Ye et al., 1997). Enfin, LBR co-immunoprécipite avec HA95, une protéine impliquée dans la régulation des interactions entre la chromatine et l'enveloppe nucléaire (Martins et al., 2000).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 8 : Représentation des interactions du LBR (Gruenbaum et al., 2005).

La région transmembranaire de LBR présente un haut degré d'identité de séquence avec les réductases de stérols du réticulum endoplasmique que l'on trouve chez les plantes, les levures et les animaux (Holmer et al., 1998; Schuler et al., 1994). De plus, le LBR humain a une activité C14-stérol réductase quand il est exprimé dans la levure (Silve et al., 1998). Ceci suggère que le LBR est une protéine « bifonctionnelle » impliquée dans l'organisation nucléaire et le métabolisme des stérols. De manière consistante, les maladies génétiques causées par des mutations dans LBR entraînent des déformations du noyau des granulocytes et une dérégulation du métabolisme du cholestérol (Hoffmann et al., 2002; Waterham et al., 2003).

2. Les LAPs

Les protéines LAP1A, 1B et 1C (lamina-associated protein) proviennent de l'épissage alternatif d'un même gène localisé sur le chromosome humain 1p36. Elles sont constituées d'une région N-terminale nucléoplasmique, suivie d'un passage transmembranaire (Martin et al., 1995). Les LAP1A et LAP1B interagissent avec les lamines A, C et B1, alors que LAP1C n'interagit pas avec les lamines (Foisner and Gerace, 1993). Néanmoins, LAP1C est associé *in vivo* à un complexe protéique de haut poids moléculaire qui contient une protéine kinase et les lamines de type-B (Simos et al., 1996). Les complexes contenant LAP1 sont distincts de ceux contenant LAP2 ou LBR, et il est proposé que ces différents complexes occupent des territoires indépendants dans la membrane nucléaire interne (Maison et al., 1997).

Six isoformes de LAP2, aussi nommées thymopoiétines, ont été identifiées chez les mammifères (figure 9). Elles sont produites à partir de l'épissage alternatif d'un gène unique localisé sur le chromosome 12q22. Récemment, il a été montré qu'une mutation dans ce gène conduisant à une modification du domaine C-terminal de LAP2 α provoque une cardiomyopathie (Taylor et al., 2005).

Les isoformes de LAP2 partagent une région N-terminale de 187 acides aminés (figure 9). LAP2 β , LAP2 γ , LAP2 δ et LAP2 ϵ sont ancrées à la membrane nucléaire interne par un segment transmembranaire et leur région N-terminale est nucléoplasmique, alors que LAP2 α et LAP2 ζ sont entièrement nucléoplasmiques. LAP2 β possède un long segment nucléoplasmique constitué de 408 résidus. LAP2 γ , LAP2 δ , LAP2 ϵ et LAP2 ζ possèdent seulement une partie de ce segment. LAP2 α possède une région C-terminale unique de 506 résidus (Furukawa et al., 1995; Harris et al., 1995; Vlcek et al., 2001; Vlcek et al., 1999).

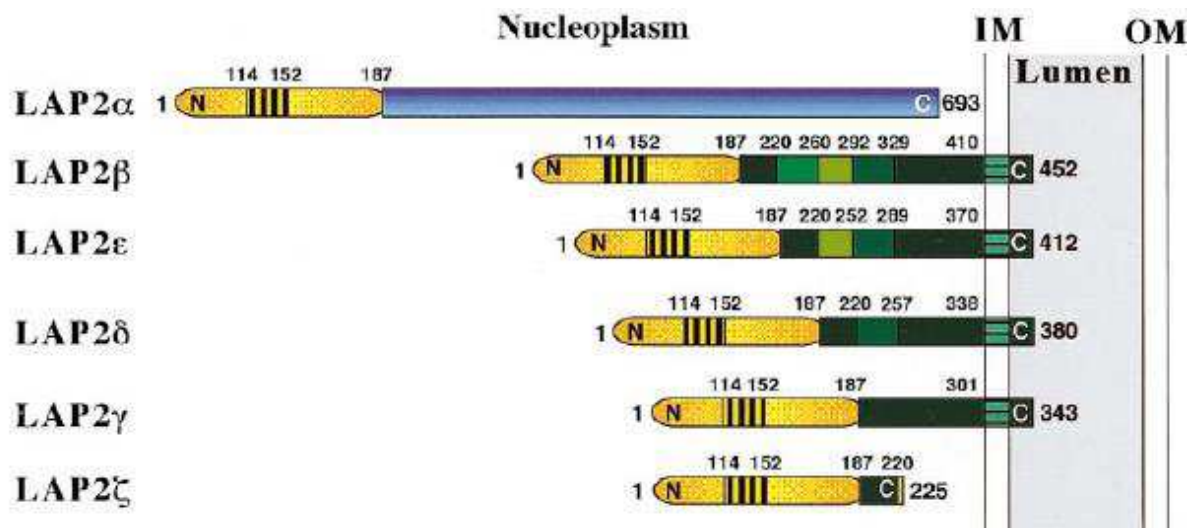


Figure 9: Représentation schématique de l'organisation structurale des protéines de la famille LAP2 (Dechat et al., 2000). La partie N-terminale commune à toutes les isoformes (en jaune) contient un domaine conservé, le LEM (partie hachurée). La plupart des isoformes sont structurellement proches et diffèrent seulement par de petites insertions dans la région nucléoplasmique (montrées par différents tons de vert). LAP2 α contient une région C-terminale unique (en bleu) sans passage transmembranaire.

Dans la région N-terminale de toutes les isoformes de LAP2, on retrouve un domaine globulaire d'environ 50 résidus, commun à différentes protéines de la membrane nucléaire interne : le domaine LEM (LAP2-Emerine-MAN1, figure 10) (Lin et al., 2000). De plus, dans toutes les isoformes de LAP2, un domaine LEM-like a été identifié en amont du domaine LEM (Lin et al., 2000). La structure tridimensionnelle de ces deux domaines de LAP2 β a été résolue au laboratoire (Laguri et al., 2001) puis par le groupe de M. Clore (Cai et al., 2001) (figure 10). Ces domaines sont composés de deux longues hélices α parallèles. Ils interagissent soit avec la protéine BAF (barrier-to-integration factor) qui se lie à l'ADN pour le LEM, soit directement avec l'ADN pour le LEM-like, d'après l'étude du groupe de RMN de M. Clore (Cai et al., 2001). De plus, la région 1-85 comprenant le domaine LEM-like se lie aux chromosomes *in vivo* (Furukawa et al., 1998). Le segment nucléoplasmique 298-408 de LAP2 β interagit avec le domaine central des lamines B1 dans des expériences de double-hybride (Furukawa et al., 1998), et est responsable de la rétention à l'enveloppe nucléaire de LAP2 β (Foisner and Gerace, 1993). L'interaction LAP2 β /lamine de type B est inhibée par la phosphorylation mitotique (Foisner and Gerace, 1993). Enfin, la région 137-242 comprenant une partie du domaine LEM se lie à la protéine nucléaire HA95, et lorsque cette liaison est inhibée, la réplication de l'ADN n'est plus initiée *in vitro*, l'entrée en phase S est bloquée *in vivo* et la protéine Cdc6 (cell-division-cycle protein-6) est protéolysée (Martins et al., 2003).

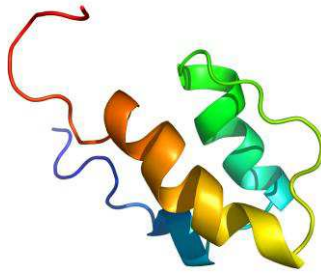


Figure 10: Représentation de la structure tridimensionnelle du domaine LEM de LAP2 (Laguri et al., 2001).

3. L'émerine

En 1994, l'équipe de D. Toniolo a identifié un gène sur le chromosome X codant pour une protéine de 254 acides aminés, l'émerine, mutée dans l'EDMD (Emery Dreyfuss Muscular Dystrophy) liée au chromosome X (Bione et al., 1994). Cette pathologie entraîne des contractures au niveau des coudes, des tendons d'Achille et des muscles post cervicaux, et une détérioration lente et progressive des muscles accompagnée d'une cardiomyopathie entraînant l'arrêt cardiaque. Les équipes de K. Arahata et de G.E. Morris ont ensuite montré que l'émerine était une protéine de l'enveloppe nucléaire, le plus souvent absente chez les patients atteints d'EDMD liée à X (Manilal et al., 1996; Nagano et al., 1996). La mutation ou l'absence d'émerine est donc responsable d'une forme d'EDMD dont les symptômes sont identiques à ceux de la forme d'EDMD provoquée par certaines mutations dans les lamines de type A (Nagano et al., 1996).

L'émerine possède une région N-terminale nucléoplasmique de 220 résidus, suivi d'un segment transmembranaire et d'une queue luminale d'une dizaine de résidus. La région nucléoplasmique est nécessaire et suffisante à la rétention de l'émerine à la membrane interne du noyau (Ostlund et al., 1999). Un domaine LEM est retrouvé en N-terminal (Lin et al., 2000; Wolff et al., 2001). Ce domaine interagit avec une protéine nucléoplasmique liant l'ADN appelée BAF (Barrier to Autointegration Factor) selon les expériences de blot overlay et de co-immunoprécipitation du groupe de K. Wilson (Lee et al., 2001).

Le domaine nucléoplasmique de l'émerine lie les lamines A et C (figure 11). Les équipes de J.A. Ellis et de C.J. Hutchison ont montré cette interaction par co-immunoprécipitation à partir de lysats de noyaux (Fairley et al., 1999; Vaughan et al., 2001) et l'équipe de G.E. Morris l'a confirmée par Biacore (Clements et al., 2000). Deux autres équipes ont ensuite délimité plus précisément les régions d'interaction de ces deux protéines. L'équipe de K. Wilson par des expériences de blot overlay avec des mutants d'émerine, a

montré que la région centrale de l'émerine, des résidus 70 à 178, était impliquée dans l'interaction avec la lamine A entière (Lee et al., 2001). L'équipe de S. Ishiura a étudié l'interaction émerine-lamine par des cribles de double hybride et montré que la région 384-566 de la lamine A était nécessaire et suffisante pour interagir avec l'émerine 1-225 (Sakaki et al., 2001).

L'émerine a aussi été décrite comme interagissant avec les filaments d'actine dans le noyau sur la base d'expériences de cosédimentation (Holaska et al., 2004). Récemment, l'équipe de E.M. McNally a montré que l'émerine et la lamine A lient aussi la nesprine-1 α par blot overlay (Mislow et al., 2002). Enfin, l'équipe de I. Karakesisoglou a montré une interaction directe par des expériences de GST pulldown mais entre la nesprine-2, l'émerine et la région C-terminale de la lamine (Libotte et al., 2005). Cette interaction a été confirmée par l'équipe de C.M. Shanahan avec des expériences de co-immunoprécipitation entre la nesprine-2, l'émerine et la lamine A/C (Zhang et al., 2005). Donc la nesprine-2 pourrait stabiliser un complexe impliquant la lamine et l'émerine.

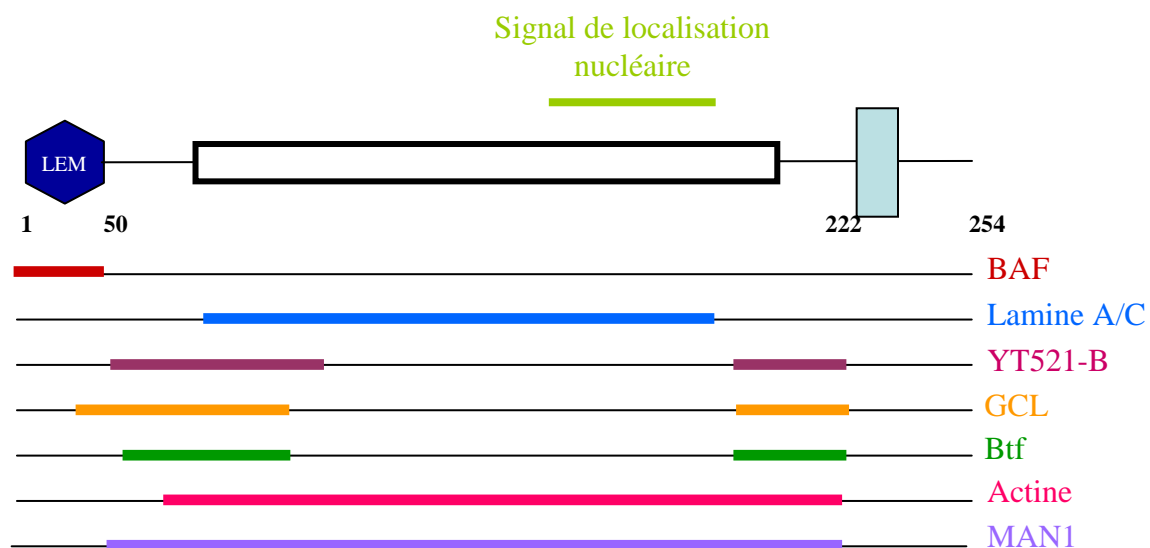


Figure 11 : Représentation schématique de l'émerine avec ses interactions connues

Cependant, et en dépit de l'attention considérable dont l'émerine fait l'objet depuis quelques années, la signification physiologique de ces interactions protéine-protéine et les conséquences moléculaires d'un manque d'émerine ne sont pas claires.

L'analyse de fibroblastes de malades ou de cellules transfectées par des gènes codant pour des mutants d'émerine a souligné la faiblesse des interactions entre l'émerine et les lamines de type A (Clements et al., 2000; Fairley et al., 1999) qui provoque une augmentation de la solubilité de tous les types de lamines (Markiewicz et al., 2002b). En effet, dans les expériences biochimiques de séparation des fractions solubles et insolubles, toutes les lamines extraites de fibroblastes sains témoins sont observées dans la fraction insoluble. En

comparaison, pour les fibroblastes de patients atteints d'EDMD liée au chromosome X, une partie des lamines est observée dans la fraction soluble. On peut penser qu'un mécanisme similaire pourrait avoir lieu dans les formes d'EDMD autosomiques causées par des mutations dans les lamines de type A. Cependant, l'organisation spatiale des chromosomes étudiée dans les cellules des patients avec EDMD liée au chromosome X n'est pas altérée (Boyle et al., 2001).

4. MAN1

La protéine MAN1 humaine a été identifiée comme la cible d'auto-anticorps chez un patient atteint de collagénose (Paulin-Levasseur et al., 1996). Elle comporte 911 résidus et est codée par un gène localisé sur le chromosome 12q14 (Lin et al., 2000). Il a été montré récemment que l'ostéopoikilose, le syndrome de Buschke-Ollendorff et la mélorhéostose sont des variants alléliques causés par des mutations dans le gène de MAN1 (Hellemans et al., 2004). L'ostéopoikilose est une dysplasie autosomique dominante du squelette caractérisée par une distribution de zones hyperostotiques, à différents endroits. Elle peut se produire soit comme une anomalie isolée, soit dans une association avec d'autres anomalies des os et de la peau (Chigira et al., 1991). Le syndrome Buschke-Ollendorf est une association de l'ostéopoikilose avec des lésions sur les tissus (Giro et al., 1992). La mélorhéostose est caractérisée par une hyperostose (hypertrophie de plusieurs os touchant leur architecture et leur forme) des membres et s'accompagne d'une atrophie (diminution de poids et de volume) de la musculature et d'une altération du derme et de l'épiderme. Les fibroblastes des patients avec ces désordres présentent une augmentation anormale de l'expression des gènes cibles de TGF- β .

MAN1 est composée d'une longue région N-terminale d'environ 450 résidus, suivi de deux segments transmembranaires et d'une région C-terminale d'environ 230 résidus. Les deux régions N- et C-terminales sont nucléoplasmiques. La région N-terminale de MAN1 est nécessaire pour la rétention de la protéine à la membrane nucléaire interne (Wu et al., 2002). MAN1 peut diffuser librement dans la membrane du réticulum endoplasmique mais sa diffusion latérale est limitée dans la membrane nucléaire interne ce qui suggère une interaction avec un composant de la lamina nucléaire. L'analyse bioinformatique de la séquence de MAN1 montre que cette protéine possède, en N-terminal, un domaine LEM, qu'elle partage avec d'autres protéines de la membrane nucléaire interne comme LAP2 et l'émerine (Lin et al., 2000). Dans la région C-terminale de MAN1, un domaine UHM (U2AF Homology Motif) est prédit (Kielkopf et al., 2004). Ce domaine possède un repliement

identique à celui de l'un des domaines de liaison à l'ARN les plus répandus, le RRM, mais est en général impliqué dans des interactions protéine-protéine (Kielkopf et al., 2004).

L'équipe de Y. Gruenbaum a montré que MAN1 et l'émerine possédaient des fonctions communes chez *C. elegans*. En effet, comme l'émerine, MAN1 interagit avec la lamine de *C. elegans* qui est une lamine de type B et avec BAF *in vitro*. De plus, dans les cellules de levure n'exprimant pas l'émerine, une réduction partielle de MAN1 est létale (Liu et al., 2003).

Des expériences de blot overlay ont montré que la région nucléoplasmique N-terminale entière de MAN1 humaine lie la région dite « queue » de la prélamine A (résidus 394 à 664) et de la lamine B1 (résidus 395 à 586) ainsi que l'émerine. L'équipe de K.L. Wilson a aussi montré que les régions N- et C-terminales de MAN1 lient la protéine BAF par des expériences de microtitrage sur billes (Mansharamani and Wilson, 2005).

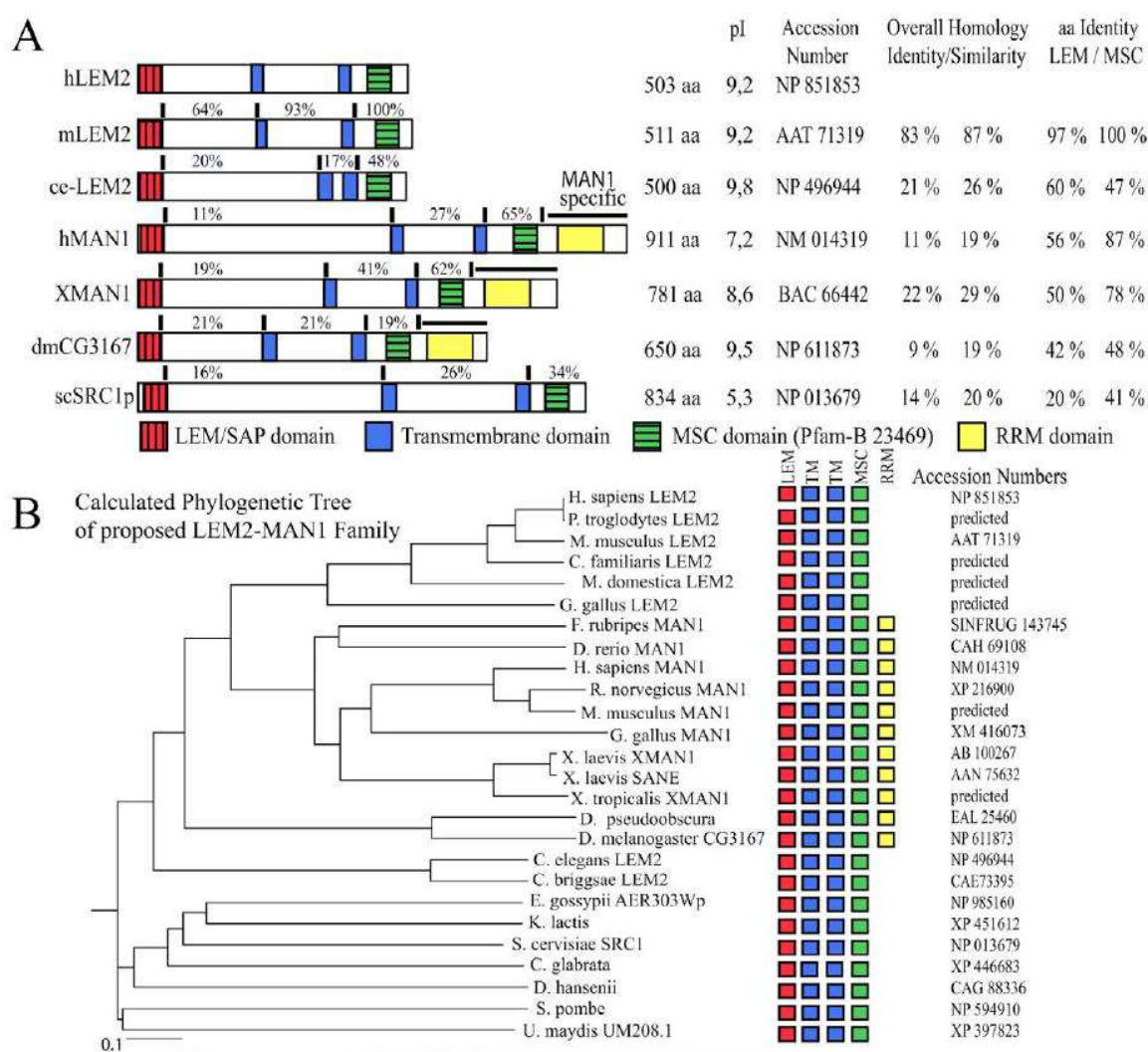


Figure 12 : LEM2 est un nouveau membre de la famille des protéines à domaine LEM et de la sous-famille de MAN1 (Brachner et al., 2005). **A**) Comparaison de l'organisation en domaine de LEM2 humain (hLEM2) avec ses orthologues chez la souris (mLEM2) et *C. elegans* (Ce-LEM2), puis avec les protéines MAN1 de l'humain (hMAN1), de *Xenopus laevis* (XMAN1), de *Drosophila*

(dmCG3167) et de *Saccharomyces cerevisiae* (scSRC1p). Les pourcentages d'identité en acide aminé, par rapport à LEM2 humain, sont indiqués pour chaque domaine (délimité par les barres noires), incluant la région N-terminale, la partie luminale et la région C-terminale. La région spécifique de MAN1 est soulignée par une ligne noire. Les domaines LEM/SAP sont en rouge, les domaines transmembranaires en bleu, les domaines MSC en vert et les domaines RRM spécifiques à MAN1 en jaune. **B)** Cladogramme montrant les divergences phylogénétiques prédites entre les membres de la famille MAN1-LEM2. L'organisation en domaine est schématiquement indiquée par les boîtes colorées. Le même code couleur que A) a été adopté.

Enfin, l'équipe de J. Gotzmann a découvert récemment une protéine humaine, LEM2, de 503 acides aminés qui comporte une organisation en domaines similaire à celle de MAN1 : un motif LEM en N-terminal, deux segments transmembranaires et une région C-terminale hautement conservée (figure 12). MAN1 se différencie de cette protéine LEM2 par la présence du domaine UHM dans sa région C-terminale (Brachner et al., 2005).

IV. La lamina nucléaire

Pour la première fois en 1966, grâce à la microscopie électronique, D.W. Fawcett a décrit la lamina nucléaire des cellules de vertébrés comme étant une structure fibreuse qui souligne la membrane nucléaire interne (figure 13) (Fawcett, 1966). Environ une décennie plus tard, l'équipe de G. Blobel a démontré que la lamina des vertébrés est associée avec les complexes des pores nucléaires et est composée majoritairement de trois polypeptides appelés lamine A, lamine B et lamine C (Aaronson and Blobel, 1975; Dwyer and Blobel, 1976; Gerace et al., 1978). A la même époque, Franke et ses collègues ont obtenu des preuves biochimiques et morphologiques qu'un réseau de fibres connecte les complexes des pores nucléaires dans les ovocytes d'Amphibiens (Scheer et al., 1976). En 1980, L. Gerace et G. Blobel ont montré pour la première fois que la dépolymérisation de la lamina nucléaire pendant la mitose du cycle cellulaire corrèle avec l'hyperphosphorylation de ses composants protéiques majeures (Gerace and Blobel, 1980). Une décennie encore plus tard, les sites spécifiques de phosphorylation associés au désassemblage de la lamina ont été identifiés (Heald and McKeon, 1990; Peter et al., 1990; Ward and Kirschner, 1990). En 1986, deux groupes ont fourni des preuves biochimiques et morphologiques de la structure en filaments intermédiaires de la lamina nucléaire (Aebi et al., 1986; Goldman et al., 1986). La même année, le clonage de l'ADNc des composants de la lamina dans les laboratoires de G. Blobel (Fisher et al., 1986) et M.W. Kirschner (McKeon et al., 1986) a démontré que les lames nucléaires étaient membres de la famille des protéines des filaments intermédiaires. La lamina est donc un réseau de polymères de lames qui s'intercale entre la chromatine et la membrane nucléaire interne de l'enveloppe nucléaire.

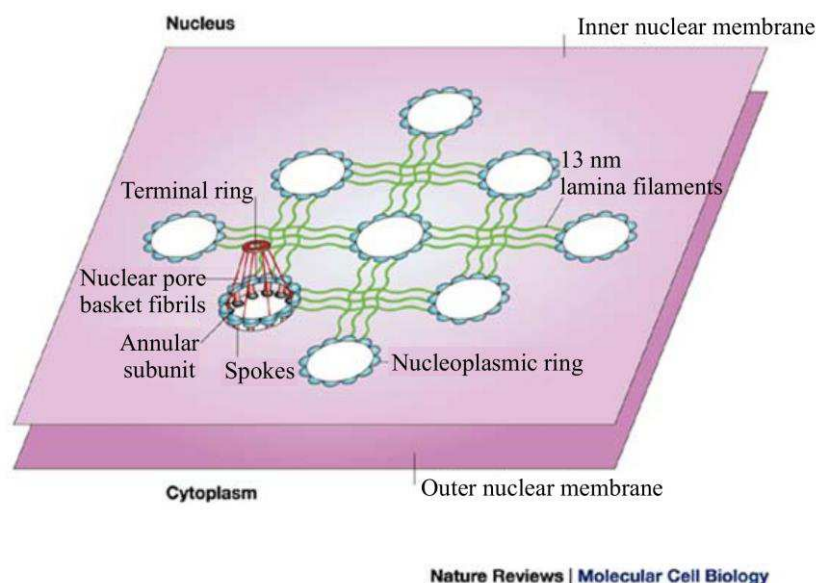


Figure 13: Organisation des filaments de la lamina nucléaire à la membrane nucléaire interne (Hutchison, 2002).

Dans les vésicules germinales d'ovocytes de *Xenopus laevis*, la lamina est un réseau à deux dimensions de filaments entrelacés qui sont connectés aux complexes des pores nucléaires (NPCs) (Aebi et al., 1986; Zhang et al., 1996), alors que dans les cellules somatiques, cela semble être une structure tridimensionnelle (Belmont et al., 1993). La lamina supporte et solidifie la membrane nucléaire interne (Hutchison et al., 2001) et se distingue du dispositif architectural des réseaux du cytosquelette, lesquels sont typiquement tridimensionnels et hautement ramifiés (Quinlan et al., 1995).

1. Les gènes des lamines

Les protéines formant des filaments intermédiaires sont exprimées dans presque toutes les cellules métazoaires, où elles forment une partie du cytosquelette, mais elles sont absentes de toutes les plantes et les champignons étudiés jusqu'ici (Fuchs and Weber, 1994; Herrmann and Aebi, 2000). Dans les mammifères, la superfamille des filaments intermédiaires compte environ 60 membres, qui se répartissent dans 5 groupes (Karabinos et al., 2002), dont 4 sont cytoplasmiques (I-IV). Les lamines composent le type V de la famille des filaments intermédiaires, dont les membres semblent être les ancêtres de la superfamille des filaments intermédiaires (Doring and Stick, 1990). Chez les mammifères, la famille de type V est constituée de trois gènes (LMNA, LMNB1 et LMNB2) qui codent pour sept protéines (Tableau 1).

Organisme	Lamine	Mode de synthèse	Expression
Lamines de type A			
Mammifères	A, A Δ 10, C	Produits de l'épissage alternatif de LMNA	Cellules différenciées
	C2	Produit de l'épissage alternatif de LMNA	Spécifique des cellules germinales
Oiseaux	A	Produit d'un unique gène	Cellules différenciées
Amphibiens	A, C	Produit de l'épissage alternatif d'un même gène	Cellules différenciées
Arthropodes	C	Produit d'un unique gène	La plupart des cellules du Blastocyste
Lamines de type B			
Mammifères	B1	Produits du gène LMNB1	La plupart des cellules
	B2	Produit de l'épissage alternatif de LMNB2	La plupart des cellules
	B3	Produit de l'épissage alternatif de LMNB2	Seulement dans les spermatocytes
Oiseaux	B1, B2	Produit d'un unique gène	La plupart des cellules
Amphibiens	Li	Produit de gènes uniques	La plupart des cellules de l'étape blastula
	Lii	Produit de gènes uniques	La plupart des cellules de l'étape blastula
	Liii	Produit de gènes uniques	Ovocytes et œufs
	Liv	Produit de gènes uniques	Spermatocytes
Arthropodes	Dm0	Produit d'un unique gène	La plupart des cellules de l'œuf
Nématode	LMN-1	Produit d'un unique gène	La plupart des cellules de l'œuf

Tableau 1 : Les lamines dans les différentes phylogénies (Hutchison, 2002).

Ces protéines sont classées en lamines de type-B et de type A en fonction de leurs propriétés biochimiques et de leur comportement pendant la mitose. L'expression d'une ou plusieurs lamines de type-B est essentielle à la viabilité des cellules chez les métazoaires. Ces lamines B sont exprimées dans toutes les cellules pendant le développement, ont un point isoélectrique acide, et présentent des modifications post-traductionnelles par isoprénylation. Cette modification permet l'attachement des lamines de type B à la membrane nucléaire interne (et aux protéines de la membrane nucléaire interne) pendant l'interphase et leurs permet de rester attachées aux membranes (spécifiquement aux membranes du réticulum endoplasmique) quand l'enveloppe nucléaire se désassemble pendant la mitose (Gruenbaum et al., 2000; Lehner et al., 1987; Stewart and Burke, 1987; Stick and Hausen, 1985; Wills et al., 2001).

Les lamines de type A se divisent en deux sous-classes principales, les lamines A et les lamines C qui sont identiques pour leur 566 premiers résidus, et diffèrent uniquement par leur partie C-terminale, 7 résidus étant spécifiques de la lamine C et 99 de la lamine A. Les lamines de type A (prélamine A : 664 résidus, lamine A mature : 646 résidus, lamine C : 572 résidus) sont exprimées principalement dans les tissus différenciés, ont une point isoélectrique neutre et deviennent complètement solubles dans le cytoplasme pendant la mitose. De plus,

les lamines de type A sont probablement incorporées plus tard que les lamines de type B dans la lamina nucléaire. Certaines lamines de type A, comme A et A Δ 10, sont initialement isoprénylées, mais la séquence C-terminale contenant la modification est ensuite clivée par une métalloprotéase spécifique, ZMPSTE24, pour former la protéine mature. Les lamines C et C2 ne sont ni isoprénylées, ni clivées.

Les mammifères, les amphibiens et les poissons expriment tous plusieurs types de lamines (Hofemeister et al., 2002; Stick, 1988). Les invertébrés ont typiquement moins de lamines différentes. Par exemple, la *Drosophila melanogaster* exprime deux lamines, nommées Lamine Dm0 (une lamine de type B) et Lamine C (une lamine de type A) (Lenz-Bohme et al., 1997), alors que *Caenorhabditis elegans* exprime une seule lamine, une lamine de type B, LMN-1 (aussi connue sous le nom de Ce-lamin) (Lee et al., 2000).

2. Le rôle des lamines

Les lamines sont impliquées dans l'architecture nucléaire, et dans ce cadre sont des protéines de soutien pour beaucoup de processus fondamentaux du noyau (figure 14).

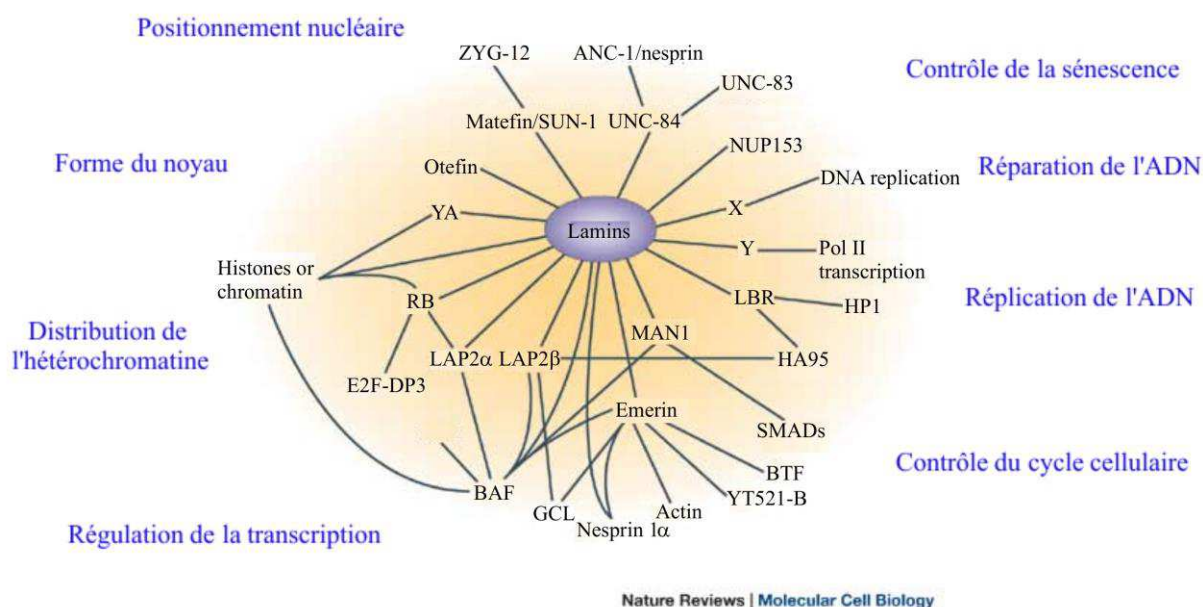


Figure 14 : Description des interactions impliquant les lamines, ainsi que des fonctions biologiques des complexes dépendants de la lamine (Gruenbaum et al., 2005).

Les lamines régulent la croissance et la forme du noyau. Elles jouent un rôle dans l'arrangement spatial des complexes des pores nucléaires et dans l'organisation de la chromatine. Les lamines sont aussi trouvées dans les sites de réplication de l'ADN et de traitement de l'ARN, ainsi qu'en association avec des protéines de la réplication et des ARN

polymérase. Cela conduit à la suggestion que les lamines influencent la duplication et l'expression des gènes (Cai et al., 2001; Gruenbaum et al., 2000). Si cette hypothèse est correcte, cela soulève d'importantes questions sur la voie dans laquelle les protéines du nucléosquelette, lesquelles sont exprimées seulement dans les lignées métazoaires (Erber et al., 1998), affectent le métabolisme nucléaire. Les lamines interviennent aussi dans le processus d'apoptose (Cohen et al., 2001). Ces protéines sont en effet des cibles très précoces des caspases, protéases spécifiques de l'apoptose. La dégradation des lamines se déroule ainsi avant la coupure de l'ADN et la condensation de la chromatine. Elle représente une étape essentielle de la dégradation de l'enveloppe nucléaire. Enfin, les lamines interagiraient avec l'actine et la titine, protéines filamentaires majoritairement cytoplasmiques mais qui auraient des isoformes nucléaires (Sasseville and Langelier, 1998; Zastrow et al., 2006). La titine nucléaire est une protéine importante pour la condensation et la ségrégation des chromosomes alors que l'actine nucléaire pourrait intervenir dans la dynamique de repositionnement des domaines de la chromatine ou dans la modification de l'état structural de la chromatine. Aujourd'hui, le pourquoi de ces interactions entre les lamines et l'actine ou la titine est encore flou mais ces interactions pourraient être liées à l'organisation nucléaire pendant l'interphase.

A. Les lamines déterminent la taille et la forme du noyau

a - La forme du noyau.

Plusieurs études soulignent le rôle de la lamina nucléaire dans la détermination de la forme du noyau (de Noronha et al., 2001; Furukawa and Hotta, 1993; Lee et al., 2000; Schirmer et al., 2001; Sullivan et al., 1999; Vigouroux et al., 2001). Dans les spermatocytes de souris, les noyaux sont en forme de crochet plutôt que sphérique, et une lamine spécifique des spermatocytes, la lamine B3, est exprimée dans ces cellules. L'expression exogène de la lamine B3 dans les cellules somatiques aboutit en un noyau adoptant une morphologie en crochet (Furukawa and Hotta, 1993). Récemment, un mutant de la lamine B1 (dominant négatif) a été construit, auquel il manque 54 acides aminés du domaine central (B1 Δ Rod) (Schirmer et al., 2001). Ce mutant est encore capable de s'assembler en filaments *in vitro* et il est incorporé à la lamina lorsqu'il est transfecté dans des cultures cellulaires. Cependant son incorporation dans la lamina cause une déformation massive de l'enveloppe nucléaire. Enfin, quand un ARN interférence (RNAi) est utilisé pour empêcher l'expression du gène de lamine Imn-1 dans *C. elegans*, le phénotype résultant est caractérisé par une morphologie nucléaire altérée.

b - La taille du noyau.

Plusieurs études basées sur l'assemblage d'extraits nucléaires de cellules d'œufs de Xénope ont montré que la lamina contrôle aussi la taille du noyau (Hutchison, 1994). Lorsque les lamines sont enlevées des extraits, l'assemblage de l'enveloppe nucléaire se produit encore mais le noyau qui en résulte est très petit (Meier et al., 1991; Newport et al., 1990). Des expériences complémentaires utilisant des mutants de lamine (dominant négatif) montrent que ces lamines empêchent l'assemblage de la lamina dans ces mêmes extraits, résultant aussi dans la formation de petits noyaux (Ellis et al., 1997; Spann et al., 1997). Finalement lorsque certains mutants d'une protéine de la membrane nucléaire interne, LAP2 β , laquelle lie les lamines B *in vivo* et *in vitro*, sont ajoutés aux extraits d'œufs, l'assemblage de la lamina et la croissance nucléaire sont tous deux inhibés (Gant et al., 1999).

c - Résistance à la déformation.

Récemment, une chimère de GFP-lamine a été utilisée pour examiner les propriétés d'assemblage de la lamina dans les cellules vivantes (Broers et al., 1997; Moir et al., 2000). Ainsi il a été montré que la surface de l'enveloppe nucléaire subit une déformation constante. Cependant, la résistance à la déformation est manifeste ; dans tous les endroits où la déformation s'est produite, la forme originale est rapidement restaurée. L'idée que la lamina est responsable de la résistance à ce type de déformation est soutenue par des études réalisées sur des noyaux de *C. elegans* dont l'expression de *lmn-1* est inhibée. Dans ces organismes, il semble y avoir une faible résistance à la déformation, et toute difformité de l'enveloppe nucléaire qui se produit est maintenue pour le reste du cycle cellulaire (Liu et al., 2000). Le fait que la composition de la lamina, ou la présence de mutants de lamine affecte la forme et la taille du noyau et la solidité de l'enveloppe nucléaire indique que la lamina doit agir comme un élément tenseur pour le noyau.

B. Association des lamines avec l'ADN et la chromatine

Plusieurs études suggèrent que les lamines de type A et B s'associent avec la chromatine (Glass et al., 1993; Luderus et al., 1992; Luderus et al., 1994; Taniura et al., 1995). En particulier, il a été montré que les fibroblastes d'embryons de souris où le gène *Lmna* n'est pas exprimé présentent une hétérochromatine hautement désorganisée à la périphérie nucléaire (Sullivan et al., 1999). En outre, l'observation des foyers de lamines intranucléaires, après transfection par des fusions GFP-lamine, montre que celles-ci sont localisées aux sites de réplication (Kennedy et al., 2000; Spann et al., 1997) ou associées à des complexes transcriptionnels (Jagatheesan et al., 1999). L'équipe de R.D. Goldman a montré

que la lamine B est associée avec les foyers de réplication de l'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire (Moir et al., 1994). D'autres études indiquent que les lamines de type A sont présentes au début de la phase G1 dans les foyers de réplication de l'ADN entourant le nucléole, lequel contient des protéines de la réplication telles que p150 et PCNA et des membres de la famille de pRb (Kennedy et al., 2000). Plus tard, pendant la phase S, les sites de réplication de l'ADN se répartissent vers des régions localisées dans tout le noyau. Comme les cellules répliquent leur matériel génétique pendant la phase S, l'association des lamines de type A avec les foyers de réplication et les membres de la famille de pRb est alors rompue. Des études avec des mutants de lamines suggèrent que l'assemblage normal de la lamina est requis pour établir les centres de réplication de l'ADN (Ellis et al., 1997) et que des lamines sont essentielles pour la phase d'élongation de la synthèse d'ADN (Spann et al., 1997).

Une étude plus récente s'élève, cependant, contre un rôle direct de pRb ou des lamines dans la synthèse d'ADN de mammifères dans des conditions physiologiques normales. Ces auteurs ne peuvent pas détecter une « rencontre » spatiale entre les sites premiers de réplication et les lamines, Rb ou le nucléole dans les cellules primaires humaines ou de rongeurs (Dimitrova and Berezney, 2002).

C. La dynamique des lamines pendant le cycle cellulaire

a - Dynamique en interphase

La dynamique de la lamina nucléaire pendant l'interphase a été examinée en utilisant des techniques de fluorescence de « blanchiment » (FLIP et FRAP) (Broers et al., 1999). Ces expériences ont montré que les lamines organisées au sein de la lamina sont très peu mobiles. Après blanchiment des GFP-lamines de type A dans la lamina, aucun recouvrement de signal de fluorescence n'est observé avant 90 minutes (Broers et al., 1999). Par comparaison avec la lamine A, après irradiation de GFP-lamine C, plusieurs cellules montrent une diminution considérable du signal de fluorescence dans la lamina (Broers and Ramaekers, 2004). Ces résultats confirment des études biochimiques qui montraient que la lamine C est plus soluble que la lamine A pendant l'interphase (Gerace and Blobel, 1982). Des études de photoblanchiment ont aussi été réalisées avec la lamine B1 et ont montré que cette protéine, une fois irradiée reste immobile encore 45 h après blanchiment (Daigle et al., 2001). Ces découvertes sont en accord avec les études biochimiques basées sur l'extraction, qui montrent que pendant l'interphase cellulaire, les lamines de type B sont hautement insolubles (Gerace and Blobel, 1982). L'implication fonctionnelle du comportement plus dynamique de la lamine C dans la lamina nucléaire reste encore à éclaircir.

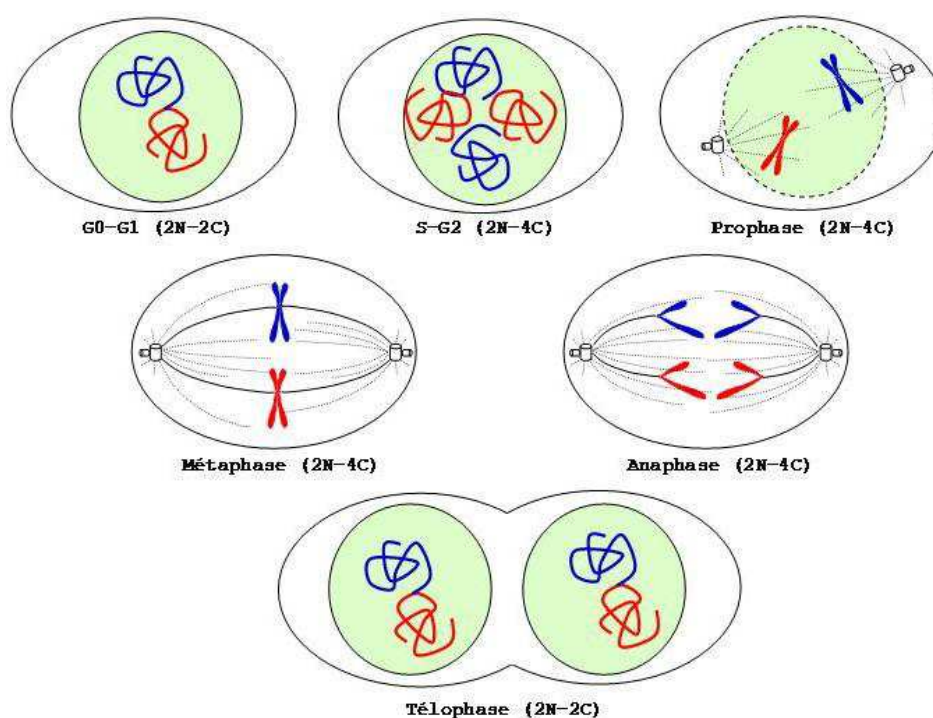
b - Dynamique pendant la mitose

Figure 15 : Les étapes du cycle cellulaire : la mitose. La cellule est représentée par un ovale et le noyau par un cercle vert. Les chromosomes paternels sont bleus, les maternels sont rouges. On ne montre qu'un couple de chromosomes homologues. (N=nombre de type de chromosome, C=nombre de chromatides).

Les changements les plus dramatiques dans l'architecture de la lamina se produisent pendant le processus de division cellulaire (figure 15). Au passage de la prophase à la prométaphase, la membrane nucléaire et la lamina se désassemblent dans les cellules de vertébrés. Ce désassemblage est régulé par la phosphorylation des lamines par la kinase $p32^{cdc2}$ (Peter et al., 1990; Ward and Kirschner, 1990). Suite à cette hyperphosphorylation, les polymères de lamine se désassemblent et les protéines de la lamina se dispersent à travers le cytoplasme. Initialement, on supposait que les lamines de type A et B présentaient des réponses différentes à la phosphorylation. Les lamines de type A seraient devenues solubles et se seraient complètement dispersées dans le cytoplasme, alors que des particules de lamines de type B seraient restées associées avec les structures de la membrane nucléaire (Nigg, 1992). Ce dernier point de vue a récemment été remis en question par des expériences en imagerie 4D combinées à la fluorescence. Ces expériences montrent que les lamines de type B sont solubles au commencement de la mitose et non associées à d'éventuelles membranes mitotiques (Beaudouin et al., 2002; Daigle et al., 2001).

On a longtemps pensé que la phosphorylation, entre autres, des lamines était la première étape de la rupture de la membrane nucléaire. Cependant, il a été montré récemment qu'à la fin de la prophase, des microtubules lient la membrane nucléaire par l'intermédiaire de

la dynéine et arrachent des fragments de membrane du noyau. L'enveloppe nucléaire est donc partiellement interrompue, ce qui permet aux kinases de rentrer dans le noyau et de phosphoryler les molécules de lamines, lesquelles se solubilisent ensuite (Beaudouin et al., 2002).

En fin d'anaphase/milieu télophase, la lamine B1 s'accumule à la région périphérique des chromosomes. Elle encercle petit à petit les chromosomes et définit un périmètre autour de la chromatine condensée jusqu'en phase G1 (Moir et al., 2000). L'accumulation des lamines A/C à la périphérie des chromosomes est plus tardive et n'est observée qu'en fin de télophase, lorsque la chromatine est décondensée (figure 16). Les lamines de type A restent dans le nucléoplasme et leur incorporation progressive dans une structure stable à l'enveloppe nucléaire se prolonge pendant la phase G1. Les lamines de type A et de type B présentent donc des voies d'assemblage différentes en sortie de mitose, lors du réassemblage de la lamina.

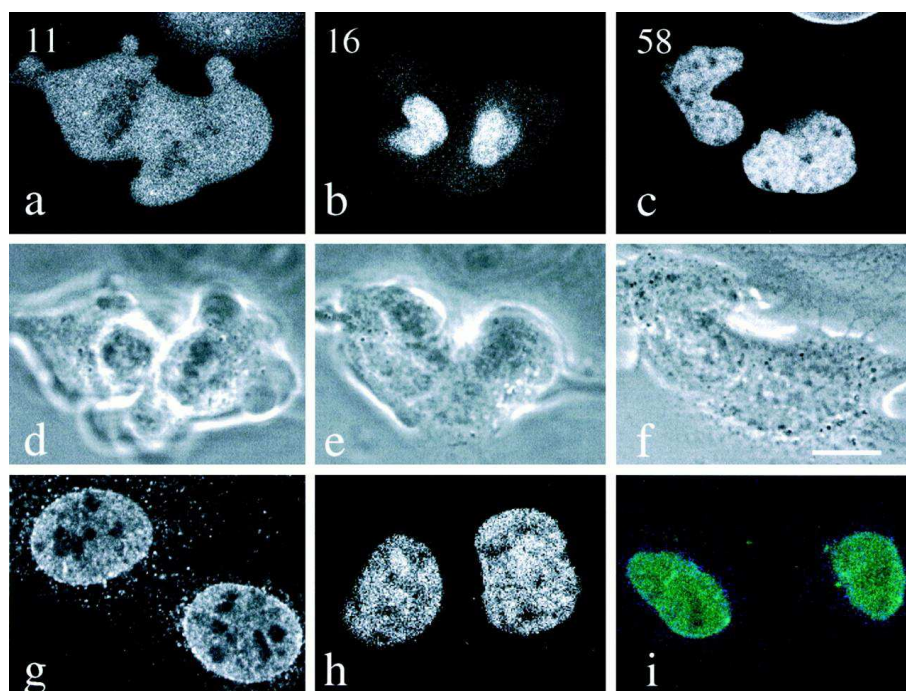


Figure 16 : Séries d'images confocales (a-c) et des contrastes correspondants (d-f) de cellules PAM vivantes exprimant la GFP-lamine A, de la fin de la télophase au début de la phase G1 (Moir et al., 2000). Les nombres dans le coin en haut à gauche indiquent les temps de transition de la métaphase à l'anaphase. (a et d), à la fin de la télophase, la lamine A reste uniformément distribuée dans le cytoplasme, excepté pour les régions contenant les chromosomes. 5 minutes plus tard (b et e), la majorité de la fluorescence est localisée dans les noyaux des cellules filles et la fluorescence cytoplasmique est très fortement réduite. L'échantillon total de fluorescence nucléoplasmique semble plus clair 58 minutes plus tard dans les cellules filles (c et f). Bar. 10µm. Les cellules PAM non-transfectées sont fixées et préparées par immunofluorescence avec des anticorps anti-lamine A/C. L'image confocale des cellules en phase G1 montre principalement des tâches nucléoplasmiques avec peu de lamine A/C dans le cytoplasme ou dans la région de la lamina nucléaire (g). La GFP-lamine C montre un profil similaire à la GFP-lamine A au début de la phase G1 (h par rapport à c). Les différences de distribution entre les lamines de type A et B en début de phase G1 sont observées à l'aide d'une double transfection des cellules qui expriment alors CFP-lamine B1 (bleu) et YFP-lamine

A (vert, i). La lamine A est localisée dans tout le nucléoplasme et la lamine B1 exclusivement à la membrane nucléaire mais il y a un chevauchement des deux protéines à la membrane. Bar, 10µm.

3. La structure

A. *Structure primaire*

Chez les vertébrés, la séquence primaire des lamines diffère de celles des protéines des filaments intermédiaires cytoplasmiques. Toutes les protéines des filaments intermédiaires sont organisées autour d'une longue région centrale de 360 résidus, qui adopte une structure en hélices α et dimérise avec la région équivalente d'un autre filament pour former quatre hélices α super enroulées (1A, 1B, 2A et 2B, figure 17). Chaque hélice α consiste en sept motifs répétés, et les lamines contiennent 42 résidus additionnels dans la partie 1B par rapport aux protéines des filaments intermédiaires cytoplasmiques des vertébrés (Fisher et al., 1986; McKeon et al., 1986). Deux segments de 16 et 30 résidus respectivement situés en N-terminal et C-terminal de la région centrale sont très conservés au sein de la famille des filaments intermédiaires. Des mutations dans ces segments empêchent l'assemblage des dimères de lamines pour former des polymères d'ordre supérieur (Heald and McKeon, 1990; Stuurman et al., 1996). De part et d'autre de ces segments se trouvent les régions appelées « tête » (environ 30 résidus) et « queue » (environ 250 résidus) des filaments intermédiaires (figure 17).

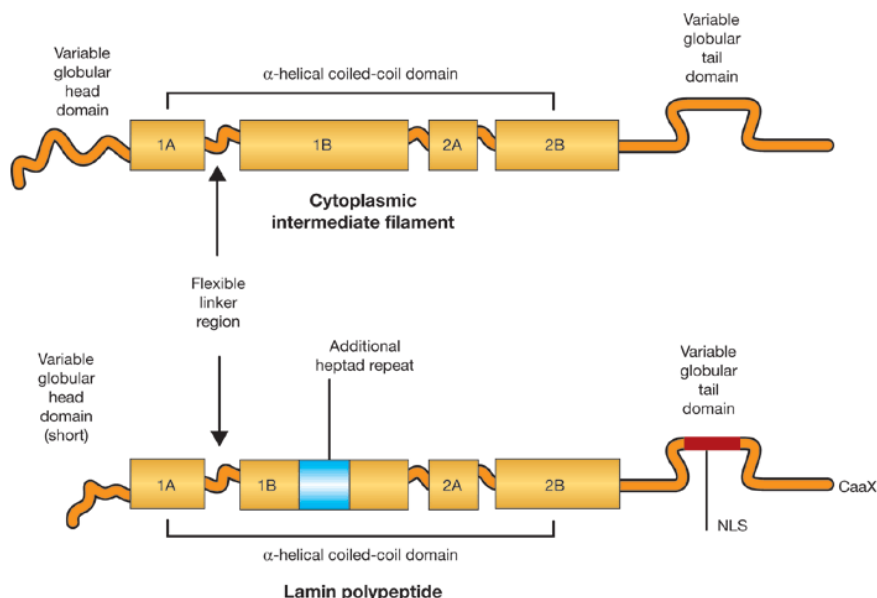


Figure 17 : Structure générale des protéines des filaments intermédiaires cytoplasmiques comparés aux lamines (Hutchison and Worman, 2004). Les protéines des filaments intermédiaires ont une structure conservée en domaine composée d'un domaine tête globulaire variable, d'un domaine central en hélice α de dimérisation et d'un domaine globulaire queue variable. Le domaine central est composé de 4 hélices α super enroulées nommées 1A, 1B, 2A et 2B, respectivement, et sont séparées par des domaines de liaison flexibles.

La partie « queue » des lamines contient un signal de localisation nucléaire (NLS) qui est une séquence d'adressage au noyau (Frangioni and Neel, 1993). Ce NLS est constitué des cinq acides aminés KKRKE dans les lamines de type A et des quatre acides aminés KRKR dans les lamines de type B. De plus, dans la plupart des lamines, une étiquette CAAX, cible de modifications post-traductionnelles est positionnée en C-terminal (Holt et al., 2001; Vorburger et al., 1989; Wagner et al., 2004). Ces deux motifs sont absents des protéines des filaments intermédiaires cytoplasmiques des vertébrés ; cependant, ils sont présents dans les protéines des filaments intermédiaires des mollusques (Riemer et al., 1998), ce qui soutient l'idée que les filaments cytoplasmiques ont évolué à partir des lamines.

B. La polymérisation des lamines

De manière générale, les membres de la famille des filaments intermédiaires polymérisent pour former des filaments d'environ 10 nm de diamètre. Toutefois, l'assemblage des lamines et la structure des filaments qui en résultent ne sont pas complètement caractérisés (Herrmann and Aebi, 2004). Les monomères de lamines dimérisent parallèlement par l'intermédiaire de leur domaine central (figure 18). Puis, les dimères s'associent à leur tour pour former un polymère orienté, avec un aspect de collier de perles (figures 18 et 19). Les têtes globulaires qui constituent les perles sont espacées de 50nm (Herrmann and Aebi, 2004).

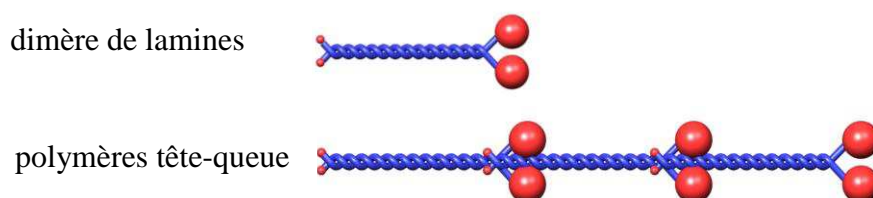


Figure 18 : Représentation schématique de l'organisation des lamines.

Enfin, *in vitro*, ces filaments s'associent latéralement, de façon antiparallèle, avec un décalage l'un par rapport à l'autre équivalent à la moitié de la longueur d'un dimère. Cet assemblage latéral se poursuit afin d'obtenir de larges structures paracrystallines présentant une alternance de bandes claires et de bandes sombres, chaque bande étant d'une largeur de 24-25nm, correspondant à la moitié de la longueur d'un dimère (figure 19) (Moir et al., 1991).

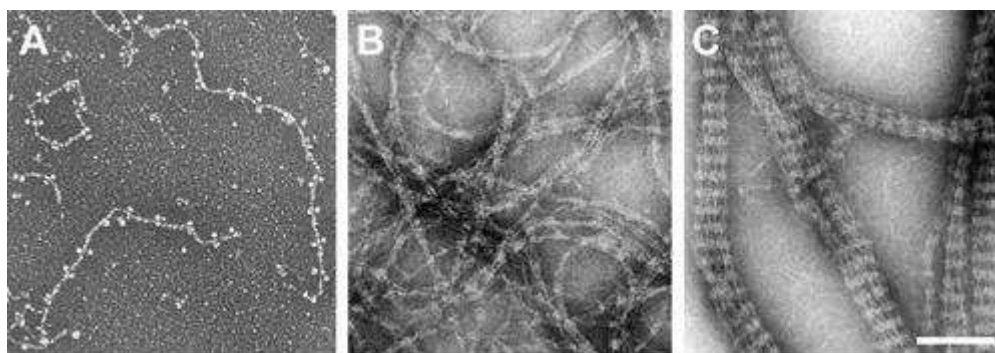


Figure 19 : Etapes de l'assemblage *in vitro* des lamines A/C observé en microscopie électronique (Herrmann and Aebi, 2004). Assemblage des lamines A/C humaines en protofilaments tête-queue « perlés » (A), fibres épaisses (B) et structures paracristallines (C). Barres = 100nm.

Les lamines de type A et B interagissent en double hybride et *in vitro* (Schirmer and Gerace, 2004; Ye and Worman, 1995), mais il n'a pas encore été montré clairement si les filaments de lamines étaient formés d'hétéropolymères ou seulement d'homopolymères *in vivo*. Récemment, l'équipe de B. Buendia a montré par FRET qu'il semble y avoir une couche de filaments de lamines de type B ancrée à la membrane interne, puis une couche juxtaposée de filaments de lamines de type A et/ou B à l'interface avec la chromatine (figure 20) (Delbarre et al., 2006).

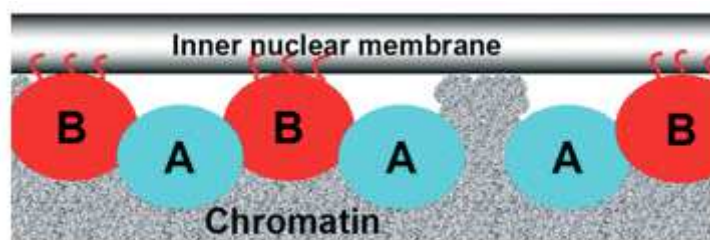


Figure 20 : Représentation schématique de l'hétérodimérisation des lamines de type A et B (Delbarre et al., 2006).

C. Structure tridimensionnelle

Afin de déterminer la structure tridimensionnelle des lamines, des essais de cristallisation du domaine central de la lamine Dm0 de *Drosophila* ont seulement abouti à des cristaux en forme d'aiguille qui ne diffractaient pas (Harel, 1998). Puis, une approche nommée « divide and conquer » a été utilisée, qui consiste à caractériser la structure tridimensionnelle d'une protéine région par région. Cette approche avait précédemment permis de résoudre par cristallographie la structure tridimensionnelle de trois fragments des régions super enroulées d'un filament intermédiaire cytoplasmique, la vimentine, et de proposer un modèle pour le dimère entier de vimentine (Strelkov et al., 2001). De la même

façon, la structure tridimensionnelle d'un dimère du domaine 2B de la région centrale de la lamine A humaine a été résolue par cristallographie et la structure du domaine 1A de la lamine A a été modélisée à partir de la structure de cette même région dans la vimentine (Strelkov et al., 2004). Enfin, les types d'interactions permettant l'amarrage des parties N- et C-terminales des parties centrales des lamines lors de l'association entre deux dimères de lamines ont été proposés (figure 21).

Sept mutations de la lamine A à l'origine de laminopathies sont trouvées dans la région centrale 2B. Ces résidus mutés sont soit conservés uniquement dans les lamines de type A et non dans les lamines de type B ou des invertébrés, soit exposés à la surface. Sur la base de ces observations, on peut penser que ces mutations n'altèrent pas la structure du dimère mais affectent des interactions utiles à l'assemblage des filaments et à la formation de la lamina.

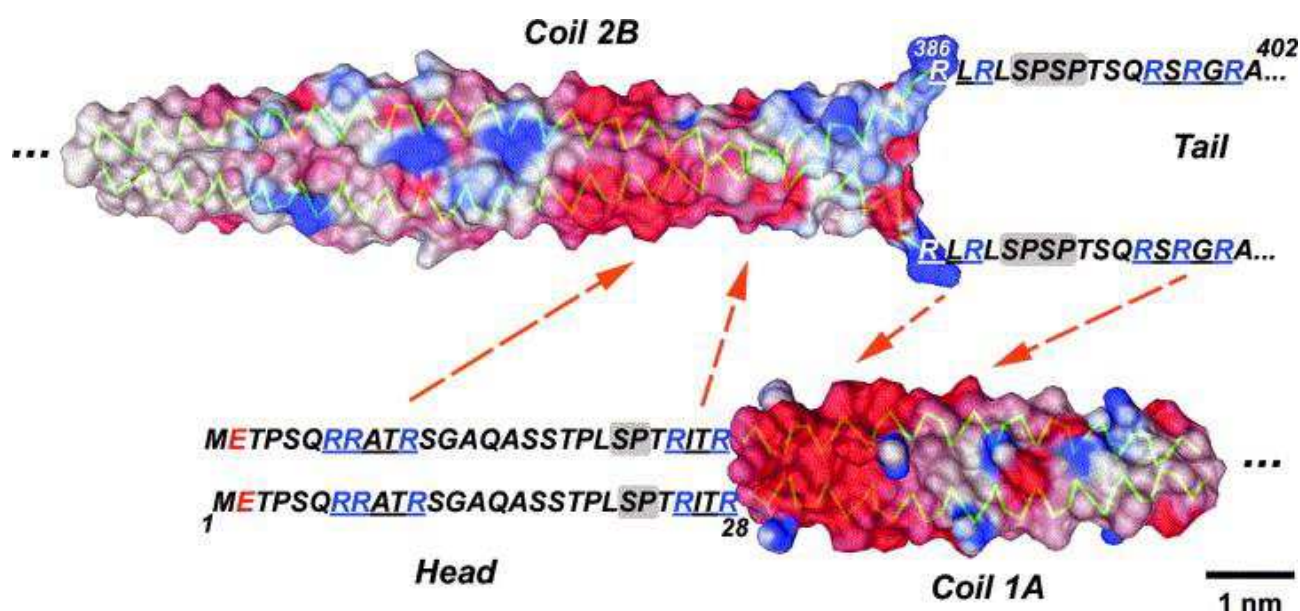


Figure 21 : Schéma représentant les interactions électrostatiques des parties N-terminale et C-terminale qui recouvrent les dimères de lamines (Strelkov et al., 2004). La structure tridimensionnelle du coil 2B et un modèle du coil 1A de la lamine A humaine sont représentés en surface de potentiel électrostatique. Les séquences d'acides aminés du domaine tête et du début du domaine queue sont aussi représentées. Les motifs de phosphorylation (SP) sont grisés et les groupes de résidus arginine sont soulignés.

La région C-terminale, dite « queue », des lamines de type A et B apparaît comme globulaire en microscopie électronique (Stuurman et al., 1998). Deux équipes ont résolu la structure tridimensionnelle d'une partie effectivement globulaire de cette région des lamines de type A humaines (par RMN dans notre laboratoire (Krimm et al., 2002) et par cristallographie (Dhe-Paganon et al., 2002)).

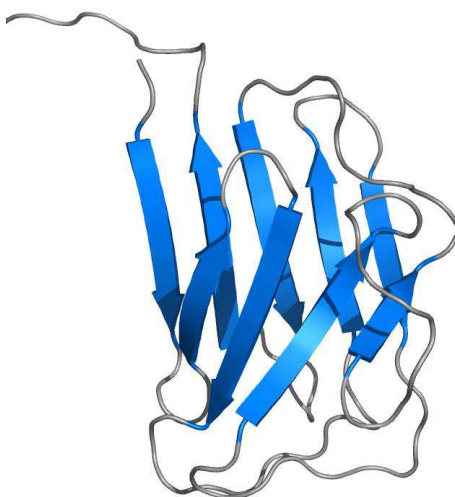


Figure 22 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la région 411-553 des lamines A/C humaines (Krimm et al., 2002).

Cette structure présente un repliement de type Immunoglobuline (IgG-like), avec deux feuillets β de quatre et cinq brins formant un β -sandwich (figure 22). Deux de ces brins, $\beta 1$ et $\beta 7$ ne sont pas trouvés dans d'autres Ig-fold connus et sont donc propres aux lamines. Le repliement de type Immunoglobuline est observé dans une grande variété de protéines aux fonctions diverses (Bork et al., 1994). En particulier, de tels domaines sont connus pour servir d'intermédiaires aux interactions protéine-protéine, protéine-ADN, et protéine-lipides (Mounkes et al., 2001). Il a été rapporté dans le cas de la lamine de type A que le domaine de type Immunoglobuline est impliqué dans la liaison à d'autres protéines appartenant soit à l'enveloppe nucléaire, soit à la chromatine (Zastrow et al., 2004).

4. Les modifications post-traductionnelles des lamines

Les séquences C-terminales de toutes les lamines de type-B et de la prélamine A contiennent un motif CAAX (C : cystéine, A : acide aminé aliphatique, X : acide aminé). Ce motif est modifié par farnésylation de la cystéine C-terminale, suivi par le clivage des trois derniers résidus du motif CAAX farnésylé et la carboxy-méthylation de la cystéine. La conséquence de ces modifications successives est une augmentation de l'hydrophobicité de la protéine modifiée, ce qui semble permettre l'ancrage des lamines à la membrane nucléaire. Les lamines de type B restent farnésylées pendant tout leur temps de vie, alors que la prélamine A est maturée. Les 15 derniers résidus C-terminaux de la prélamine A subissent un clivage protéolytique par une enzyme, ZMPSTE24, qui produit une lamine A mature (Sasseville and Raymond, 1995). Les différentes voies de maturation subies par les lamines de type B et les lamines A expliquent probablement leurs comportements différents lors de la mitose.

5. Les laminopathies

Les laminopathies représentent un groupe de maladies hétérogènes cliniquement et génétiquement, toutes dues à des défauts au sein des lamines A/C. Au nombre de ces maladies, on peut citer la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss autosomique dominante, une myopathie des ceintures, une cardiomyopathie dilatée, une forme de maladie de Charcot-Marie-Tooth, une lipodystrophie partielle de type Dunnigan, une dermopathie restrictive et des syndromes de vieillissement prématuré (figure 23, 26 et tableau 2). Depuis quelques années, des efforts de recherche importants visent à améliorer notre compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent ces pathologies.

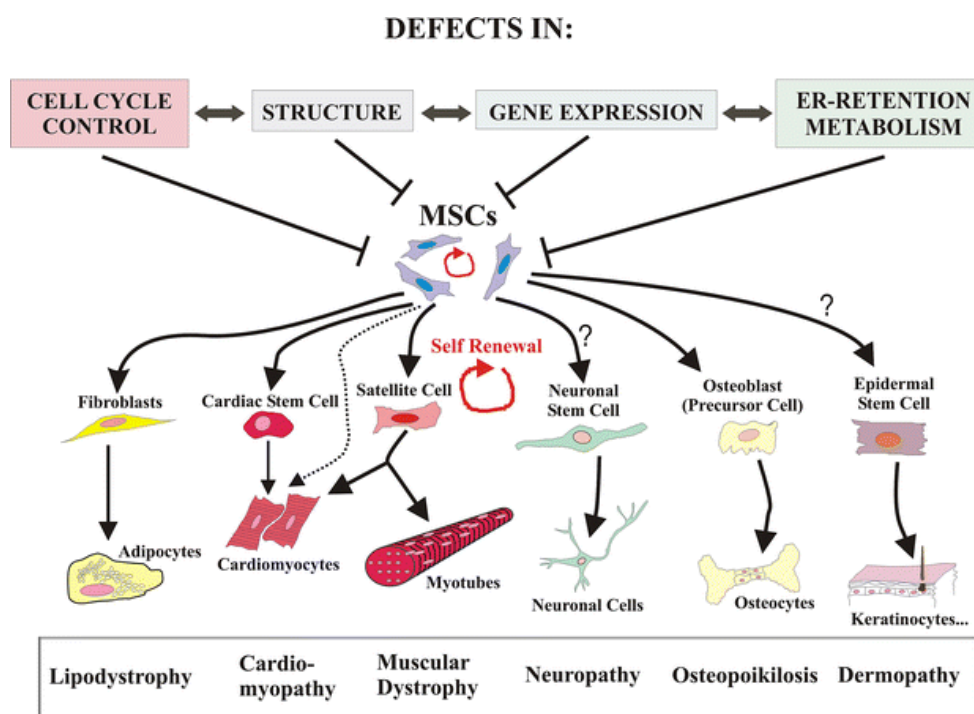


Figure 23 : Les mutations dans les lamines peuvent détériorer la plasticité ou le potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) ou des cellules précurseurs dans les tissus spécifiques dérivées des MSCs, conduisant à des phénotypes limités aux tissus. Les points d'interrogations indiquent que le rôle des MSCs dans la régénération de ces tissus n'est pas encore complètement compris (Gotzmann and Foisner, 2006).

A. Les myopathies

Les dystrophies musculaires d'Emery-Dreifuss (EDMD) sont des maladies neuromusculaires rares qui se manifestent par une faiblesse musculaire progressive, des rétractions des coudes, des tendons d'Achille et des muscles post-cervicaux et une cardiomyopathie évoluant souvent vers un arrêt cardiaque brutal. Elles débutent lors de l'enfance ou de l'adolescence, et se traitent essentiellement par la pose d'un pacemaker.

On distingue les EDMD dues à des mutations dans le gène LMNA codant pour les lamines A/C (transmission autosomique habituellement dominante voir récessive dans de très rares cas) des l'EDMD liées au chromosome X dues à des mutations dans le gène de l'émerine (Bione et al., 1994; Bonne et al., 1999).

Deux autres myopathies associées au gène LMNA existent : la cardiomyopathie dilatée avec défaut de conduction (DCM-CD) et la dystrophie musculaire des ceintures dominante de type 1B (LGMD-1B), qui engendrent toutes les deux les mêmes anomalies cardiaques que celles trouvées chez les personnes atteintes d'EDMD (Fatkin et al., 1999; Muchir, 2000; Muchir et al., 2000). Les patients avec une cardiomyopathie ont peu d'atteintes des muscles squelettiques, alors que dans le cas de la myopathie des ceintures, on observe des anomalies dans ces muscles, différentes cependant de celles trouvées chez les patients EDMD.

Les mutations dans le gène LMNA à l'origine de ces anomalies musculaires sont réparties sur l'ensemble des exons codant pour les lamines A/C. Il s'agit de mutations hétérozygotes ponctuelles faux sens, non sens ou entraînant un mauvais épissage. L'homozygotie pour l'ensemble de ces mutations semble incompatible avec la survie post-natale chez l'homme (van Engelen et al., 2005). Notamment, les individus homozygotes pour la mutation Y259X, qui induit un codon stop au milieu du domaine central, meurent à la naissance d'une insuffisance respiratoire et présentent une dystrophie musculaire généralisée.

La déplétion du gène LMNA chez la souris entraîne une réduction de leur croissance ainsi qu'une myopathie cardiaque et squelettique ressemblant aux pathologies EDMD et DCM humaines (Sullivan et al., 1999). Ces résultats indiquent que les myopathies engendrées par une mutation du gène LMNA pourraient être associées à une perte de fonction des lamines de type A.

Plus récemment, dans une étude publiée en janvier 2005, une équipe française a créé une souris homozygote pour la mutation H222P du gène LMNA (Arimura et al., 2005). Cette mutation est retrouvée fréquemment chez des patients atteints d'EDMD-AD. A l'âge adulte, ces souris ont développé une dystrophie musculaire et une cardiomyopathie dilatée similaires à celles observées en pathologie humaine. Contrairement aux patients affectés, cependant, les souris hétérozygotes pour la mutation H222P sont apparemment normales.

Au laboratoire, nous avons remarqué en analysant la structure tridimensionnelle du domaine C-terminal globulaire des lamines de type A que les mutations responsables de la LGMD-1B et de la DCM-CD sont localisées dans le cœur hydrophobe du domaine et nous avons proposé que ces mutations le déstabilisent. Nous avons vérifié cette hypothèse pour la

mutation R453W. Ceci renforce l'idée que les mutations à l'origine des myopathies entraînent une perte de fonction des lamines de type A (figure 24).

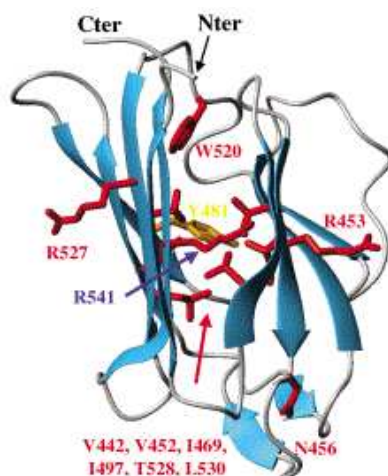


Figure 24 : Localisation des mutations causant des pathologies caractérisées par des anomalies des muscles cardiaque et squelettique (Krimm et al., 2002). En jaune, les mutations à l'origine de LGMD-1B et en rouge, les mutations DCM-CD.

B. Les lipodystrophies

Les lipodystrophies sont des syndromes caractérisés par une mauvaise répartition des graisses et sont souvent associées à des diabètes insulino-résistants (Reitman et al., 2000). La lipodystrophie partielle de type Dunnigan, aussi connue sous le nom de syndrome de Dunnigan-Köbberling, est une pathologie autosomique dominante caractérisée par une perte du tissu adipeux périphérique qui coexiste avec une adiposité centrale excessive et souvent un diabète de type II résistant à l'insuline (Dunnigan et al., 1974; Jackson et al., 1997; Köbberling et al., 1975). De nombreux sujets affectés ont une hypertrophie des muscles squelettiques (Vantyghem et al., 2004; Wildermuth et al., 1996).

Environ 90% des mutations responsables de la FPLD sont localisées dans l'exon 8 du gène LMNA, en particulier sur les résidus 482 et 486 (Cao and Hegele, 2000; Shackleton et al., 2000; Speckman et al., 2000; Vigouroux et al., 2000). Des mutations dans l'exon 11 du gène LMNA, aux codons 582 et 584, se produisent dans des cas atypiques de FPLD (Garg et al., 2001; Speckman et al., 2000; Vigouroux et al., 2000). Une substitution hétérozygote pour le résidu 133 de la région centrale de la lamine A/C humaine a aussi été décrite chez un patient atteint d'une lipodystrophie généralisée avec un diabète insulino-résistant, une hypertriglycémie, une hépatomégalie de stéatose et une cardiomyopathie hypertrophique avec implication valvaire (Caux et al., 2003). Deux familles avec une FPLD due à des mutations dans la région « tête » de la lamine A/C ont aussi été décrites avec des défauts de conduction cardiaques et des cardiomyopathies (Garg et al., 2002).

Bien que les souris *Lmna*^{-/-} développent une cardiomyopathie et une dystrophie des muscles squelettiques, elles ne présentent pas de lipodystrophie partielle ou de résistance à l'insuline (Sullivan et al., 1999). Ce fait suggère que les mutations causant la FPLD n'entraînent pas une perte de fonction des lamines A/C mais plutôt un effet dominant négatif sur certaines fonctions nécessaires à la différenciation et à la physiologie normale des adipocytes.

Récemment, l'équipe de G. Lattanzi a montré que la prélamine A était spécifiquement accumulée dans les cellules de ses patients atteints de lipodystrophie (Capanni et al., 2005). Selon cette équipe, un défaut dans la voie de maturation de la lamine entraînerait une accumulation de son précurseur ce qui serait à l'origine de la séquestration de SREBP1, un facteur de transcription adipocytaire, à la membrane nucléaire. Ce phénomène entraînerait une diminution de SREBP1 actif et causerait une détérioration de la différenciation pré-adipocytaire.

Dans le cas des lipodystrophies, l'analyse de la structure tridimensionnelle permet d'observer la localisation externe des mutations responsables de la FPLD. On peut penser que ces résidus mutés exposés au solvant sont à l'origine d'une modification de l'interaction avec un éventuel partenaire (figure 25).

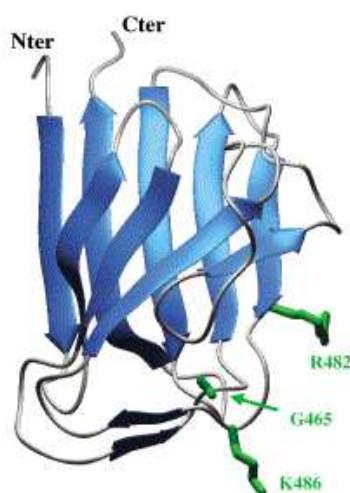


Figure 25 : Localisation des mutations causant une FPLD (Krimm et al., 2002). En vert, les mutations à l'origine de la FPLD.

C. Neuropathie périphérique

La neuropathie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT-2A) est secondaire dans certains cas à une mutation récessive du codon 298 dans le gène *LMNA* (De Sandre-Giovannoli et al., 2002). Cette pathologie se traduit essentiellement par la perte de larges fibres myélinisées et une dégénération axonale entraînant une faiblesse musculaire, sans dystrophie musculaire ni cardiomyopathie associée.

Les souris *Lmna*^{-/-} développent, en plus d'une dystrophie musculaire, une sévère neuropathie périphérique (De Sandre-Giovannoli et al., 2002). La mutation au codon 298 dans le gène LMNA pourrait donc également être associée à une perte de fonction des lamines A/C dans les cellules nerveuses.

De même, l'équipe de H. Lochmuller a récemment identifié une mutation-délétion dans la région 5' du gène LMNA qui résulte en une perte de 15 nucléotides incluant le codon initiateur ATG. De ce fait, l'initiation de la transcription de la lamine ne se fait pas à l'endroit prévu mais pourrait se faire avec une moins bonne efficacité au codon ATG situé sur le nucléotide 257. Cette délétion entraîne un phénotype clinique partagé entre EDMD et CMT-2A (Walter et al., 2005).

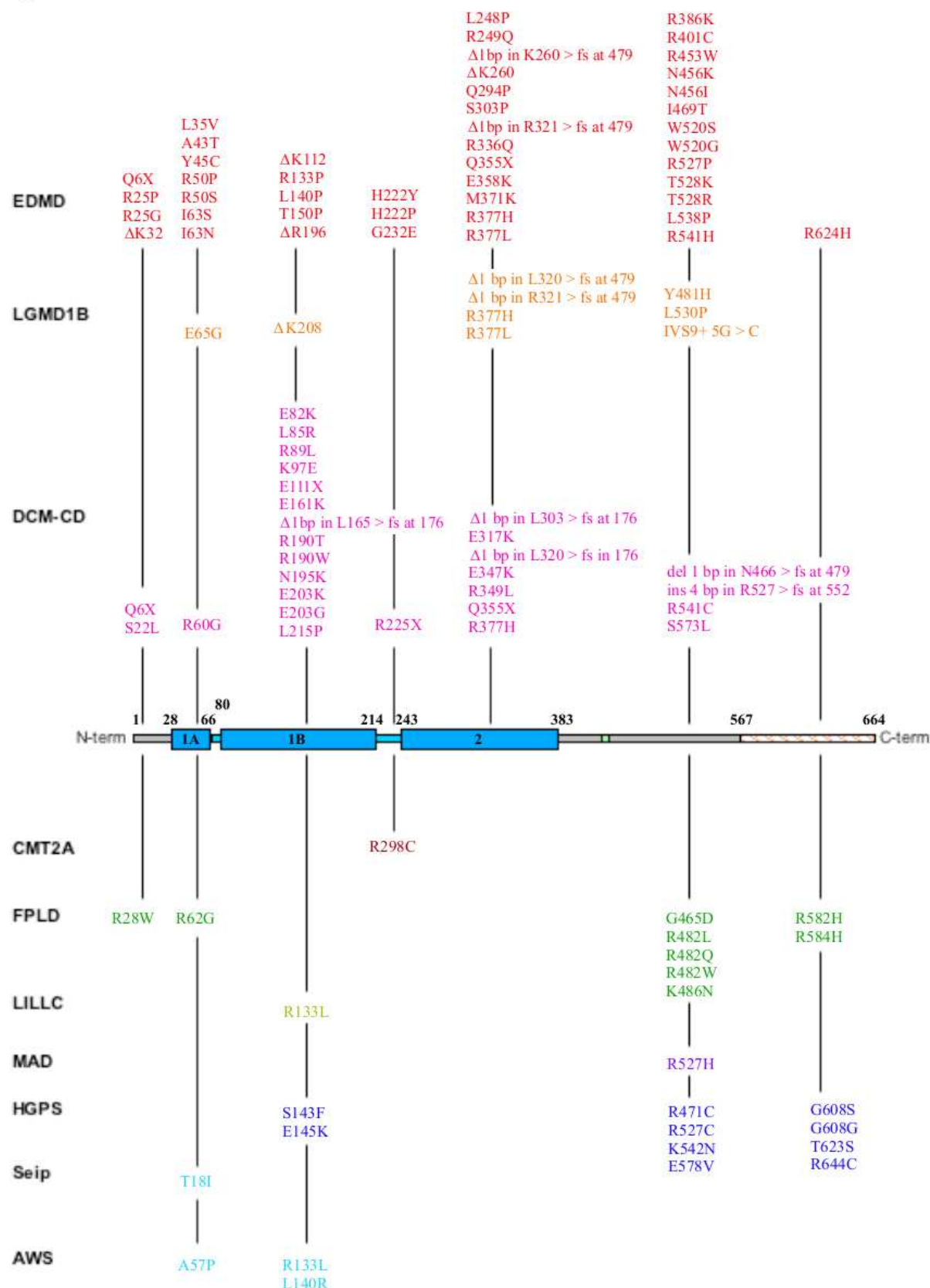


Figure 26 : Diagramme schématique de la prélamine A montrant la nature et la localisation des mutants provoquant des pathologies (Worman and Courvalin, 2005). Les numéros en noirs représentent les acides aminés. Dans le domaine C-terminal, le NLS est signalé en bleu clair et la séquence hachurée représente la séquence présente dans la lamine A et absente de la lamine C. L'abréviation des pathologies est : EDMD : Emery-Dreifuss muscular dystrophy (mutations en rouge), LGMD1B : limb-girdle muscular dystrophy type 1B (mutations en orange), DCM-CD : dilated

cardiomyopathy with conduction defects (mutations en rose). Au dessous du schéma de la molécule : CMT2A : Charcot-Marie-Tooth disorder type 2A (mutation en bordeaux), FPLD : Dunnigan-type familial partial lipodystrophy (mutations en vert foncé), LILLC : lipodystrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy (mutation en vert clair), HGPS : Hutchison-Gilford progéria syndrome (mutations en bleu foncé), Seip : Seip syndrome (mutation en bleu clair), AWS : atypical Werner syndrome (mutations en bleu clair).

D. Les syndromes de vieillissement prématuré

a - Les progérias

La progéria de Hutchinson-Gilford (HGPS) est une maladie autosomique dominante rarissime caractérisée par un syndrome de vieillissement prématuré. Les patients ont une apparence normale à la naissance mais développent des symptômes de la pathologie à partir d'un an environ. Les signes les plus marquants sont l'absence de cheveux, une tête disproportionnellement large, une perte de graisse généralisée, une peau fine, une extension incomplète au niveau des genoux et des coudes (révélatrice d'une rigidité articulaire), et l'apparence générale d'une personne âgée. La mort survient vers une quinzaine d'années par complications cardiovasculaires de type athérosclérose.

La progéria est principalement associée à une mutation ponctuelle du codon 608 du gène LMNA (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003). Cette mutation est conservatrice (G608G) mais crée un site d'épissage anormal dans l'ARN pré-messager, ce qui provoque la synthèse d'une lamine A délétée de 50 résidus ($\Delta 607-656$) à l'extrémité C-terminale. Le mutant contient le motif CAAX en C-terminal le site de clivage qui est responsable de la maturation de la lamine A est absent si bien que le mutant reste farnésylé dans les cellules. Ceci entraîne une accumulation de prélamine A à la membrane nucléaire qui affecte probablement les fonctions de la lamina. Les cellules de patients atteints de HGPS présentent des anomalies progressives de la forme du noyau, impliquant une enveloppe nucléaire repliée et une perte de l'hétérochromatine périphérique qui souligne normalement la lamina nucléaire. Mais comment l'accumulation de prélamine A observée chez les patients atteints du syndrome de vieillissement accéléré HP GS pourrait-elle contribuer au vieillissement prématuré ? Afin de comprendre si les changements de la forme du noyau sont associés avec un vieillissement normal, des expériences de microscopie confocale ont été réalisées sur la lamine de *C. elegans*. Ainsi des changements progressifs de la morphologie de la lamina nucléaire ont été observés lors du vieillissement de ce ver (Haithcock et al., 2005). Alors que dans les vers jeunes, la lamine est correctement distribuée à la périphérie du noyau, dans les vers âgés, sa distribution devient irrégulière. En parallèle, la forme du noyau change et l'hétérochromatine périphérique disparaît. Ces découvertes rappellent les altérations nucléaires progressives observées dans les cellules de patients atteints de HGPS. Ces études

supportent le parallèle entre le vieillissement (normal ou accéléré) et les malformations nucléaires.

Suite à ces observations, H. Lans et J.H. Hoeijmakers proposent que la lamine A influence indirectement la stabilité du génome car la lamina nucléaire est impliquée dans des processus tels que la réplication et l'expression des gènes, et ces processus sont intimement liés avec la signalisation qui suit les dommages et la réparation de l'ADN. La perturbation de la lamina nucléaire peut donc compromettre plusieurs voies de réparation de l'ADN et être ainsi à l'origine de la mort cellulaire et de la sénescence après l'induction des dommages ce qui déclencherait ainsi le vieillissement. Les signes d'instabilité du génome dans les cellules d'HGPS et dans les mutants L530P et G608G de souris soutiennent cette idée (Liu et al., 2005). De plus, les souris avec une lamine A anormale montrent une activité spontanée de la protéine p53, la gardienne de l'intégrité du génome. Ces observations ajoutent donc les laminopathies progéroides à la liste croissante des autres syndromes progéroides, lesquels accélèrent le vieillissement et sont tous liés à une dégradation de la stabilité du génome.

La progéria a aussi été caractérisée chez des patients avec des mutations dans la partie centrale et dans le domaine globulaire C-terminal (figure 27). En particulier, deux nouvelles mutations du domaine de type immunoglobuline ont été découvertes dans le groupe de A. van den Wijngaard, à l'hôpital de Maastricht (Verstraeten et al., 2006). Ces mutations ainsi que celles trouvées précédemment dans ce même domaine sont toutes situées sur un même site, conservé dans les lamines de type A mais non dans les lamines de type B (voir Chapitre 3).

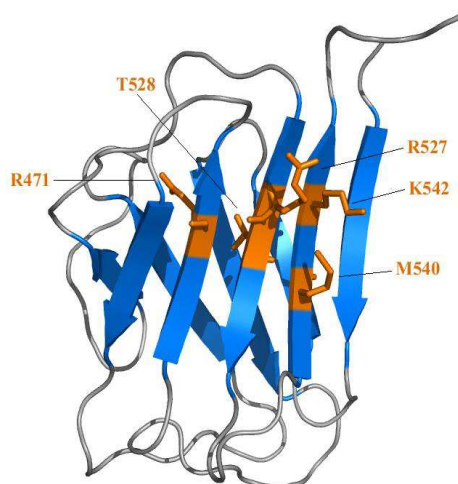


Figure 27 : Localisation des mutations causant des syndromes progéroides. En orange, les mutations à l'origine de la progéria.

D'autres mutations dans la lamine A ont été identifiées chez des patients avec des syndromes de progéria atypique tels que le syndrome atypique de Werner et le syndrome de Seip. Ces vieillissements prématurés sont dus à des mutations hétérozygotes faux sens dans le gène LMNA, qui entraînent des mutations des résidus 57, 133 et 140 (Chen et al., 2003).

L'authenticité des syndromes de Werner a été récemment sérieusement remise en cause (Bonne and Levy, 2003).

Un modèle progéroïde murin a été obtenu dans une souris « knock in » qui exprime une lamine A/C mutée L530P (Mounkes et al., 2003b). Cette mutation hétérozygote entraîne une EDMD chez l'homme (Bonne et al., 1999). Les souris sont normales à la naissance, mais développent rapidement un retard de croissance sévère et meurent après quatre ou cinq semaines. Le mécanisme de vieillissement de ces souris, lequel pourrait être soit une différenciation cellulaire accélérée, soit une mort précoce ou encore une incapacité à garder un état de différenciation terminale, n'a pas encore été résolu.

b - La dysplasie acromandibulaire

Une lipodystrophie partielle a été détectée chez les patients atteints de la dysplasie acromandibulaire (MAD). Cette pathologie dominante très rare est caractérisée par un retard de croissance post-natal, des anomalies craniofaciales, des malformations squelettiques et une tendance progéroïde. Une seule mutation dans le gène LMNA (R527H) a été trouvée associée à cette pathologie.

c - Dermopathie restrictive

La dermopathie restrictive (RD) est une maladie autosomique récessive létale dont les patients présentent un déficit cutané qui restreint les mouvements *in utero* ou chez le nouveau né. C'est une pathologie rare caractérisée par un retard de croissance intra-utérin, une peau rigide et tendue qui cède par endroit, une vascularisation superficielle riche, une petite bouche, un petit nez pincé, une micrognathie, des défauts de minéralisation du crâne et une hypoplasie pulmonaire. Une mutation hétérozygote dans le gène LMNA qui résulte en une prélamine A tronquée à laquelle il manque 50 résidus ($\Delta 607-656$) à l'extrémité C-terminale aussi absents dans HGPS, est à l'origine de cette pathologie. Dans d'autres cas, une insertion hétérozygote introduisant un codon de terminaison précoce dans ZMPSTE24 est en cause. Par conséquent, il semble que des mutations dans les lamines de type A et dans la protéase ZMPSTE24 entraînent des maladies avec des phénotypes qui se chevauchent, telle que MAD, HGPS et RD. Un phénotype néonatal de « peau tendue » a été récemment rapporté chez un patient avec une HGPS classique (Sevenants et al., 2005).

Dans des souris où il n'y a pas de ZMPSTE24, la maturation de la lamine A ne se fait pas (Bergo et al., 2002; Leung et al., 2001; Pendas et al., 2002). Ces souris ont des anomalies sévères, incluant un retard de croissance, une micrognathie, des lésions ostéolytiques dans les

os et une ostéoporose. Beaucoup de ces traits phénotypiques sont similaires avec ceux des patients humains avec une HGPS et une MAD.

E. Les mécanismes des laminopathies

Un des enjeux stimulant pour les chercheurs qui étudient l'enveloppe nucléaire est de comprendre comment des mutations dans les lamines de type A aboutissent à un assortiment si vaste de conséquences cliniques. En dépit de progrès majeurs dans l'identification des mutations causant ces maladies, peu de progrès ont été accompli dans la compréhension des mécanismes pathogéniques. Cependant, des informations acquises sur les sites de ces mutations dans les molécules des lamines A et C et les effets cellulaires observés dans les cellules exprimant les mutants de lamines de type A ont conduit à développer plusieurs modèles hypothétiques de pathogenèse sur lesquels sont basés les expériences actuelles.

Le modèle « structural » postule que la perte de la fonction de la lamine de type A induit une fragilité nucléaire qui aboutit à la mort cellulaire après un stress mécanique ou d'autres facteurs environnementaux (Mounkes et al., 2003a). Dans le modèle « d'expression », les lamines jouent un rôle de plate-forme à laquelle s'ancrent des protéines de la chromatine et des complexes contenant des protéines de la régulation de l'expression des gènes (Melcon et al., 2006). Une altération des lamines de type A pourrait donc perturber l'expression de gènes spécifiques de certains tissus soit en induisant des changements anormaux dans l'organisation spatiale/structurale de la chromatine, soit en dégradant les interactions entre les lamines de type A et certains facteurs de transcription ou régulateurs du cycle cellulaire.

Tableau 2 : Récapitulatif des maladies liées à une mutation dans les lamines de type A

Maladies	Forme d'hérédité	Phénotype majeur	Protéine de l'enveloppe nucléaire mutée
Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD-X)	Liée à X	Contractures au niveau des coudes, des tendons d'Achille et des muscles post cervicaux, détérioration lente et progressive des muscles accompagnée d'une cardiomyopathie évoluant vers l'arrêt cardiaque	Emerine
Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD-AD)	Autosomique dominante	idem	Lamine A/C
Cardiomyopathie dilatée avec défaut de conduction (DCM-CD)	Autosomique dominante	Mêmes anomalies cardiaques que EDMD	Lamine A/C
Dystrophie musculaire des ceintures de type 1B (LGMD-1D)	Autosomique dominante	Mêmes anomalies cardiaques que EDMD	Lamine A/C
Lipodystrophie partielle de type Dunnigan (FPLD)	Autosomique dominante	Perte du tissu adipeux périphérique, une adiposité centrale excessive, souvent un diabète de type II résistant à l'insuline	Lamine A/C
Dysplasie acromandibulaire (MAD)	Autosomique dominante	Retard de croissance post-natal, anomalies craniofaciales, malformations squelettiques, tendance progéroïde	Lamine A/C
Neuropathie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT-2A)	Autosomique récessive	Neuropathie moteur et sensorielle caractérisée par des faiblesses musculaires, dégénération axonale	Lamine A/C
Progéria de Hutchinson-Gilford (HGPS)	Autosomique dominante	Vieillessement prématuré	Lamine A/C
Syndrome atypique de Werner	Autosomique récessive	Vieillessement prématuré	Lamine A/C
Dermopathie Restrictive (RD)	Autosomique récessive	mouvements restreints <i>in utero</i> ou chez le nouveau né, retard de croissance intra-utérin, une peau rigide et tendue qui cède par endroits, une vascularisation superficielle riche,	Lamine A/C ZMPSTE24 (FACE-1)

V. Enveloppe nucléaire et régulation de la transcription

1. Les lamines, régulatrices de la transcription

Un certain nombre d'études relie les lamines aux processus de transcription et de post-transcription. Dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, la lamine Liii s'associe avec l'ARN polymérase II et lorsque la formation des filaments est empêchée par des mutants de lamine (négatifs dominants), l'activité de l'ARN polymérase II est inhibée (Spann et al., 2002). De plus, dans des cellules de mammifères, LAP2 β associée aux lamines de type B forme des complexes avec les facteurs de transcription GCL (Germ Cell-less) et DP qui répriment E2F (Nili et al., 2001). Enfin, les lamines de type A s'associent avec différents régulateurs de la transcription comme la protéine du rétinoblaste (Rb) (Ozaki et al., 1994), SREBP1 (Lloyd et al., 2002) et MOK2 (Dreuillet et al., 2002).

A. *Lamine, LAP2 α et Rb*

La fonction des interactions des lamines de type A avec Rb commence à s'éclaircir. Dans les fibroblastes, la lamine A/C et la protéine du nucléosquelette LAP2 α forment un complexe avec Rb qui retient Rb hypophosphorylée dans le noyau (Markiewicz et al., 2002a). Rb est hypophosphorylée en phase G1 des cellules en prolifération ou dans les cellules restant en phase G0. Sous cette forme, elle bloque la transition en phase S en inhibant l'activité des facteurs de transcription E2F (figure 28), lesquels contrôlent l'expression des gènes spécifiques de la phase S (Frolov and Dyson, 2004). La dérégulation de l'interaction Rb-E2F entraîne une hyperprolifération, un manque de différenciation, et peut conduire au cancer.

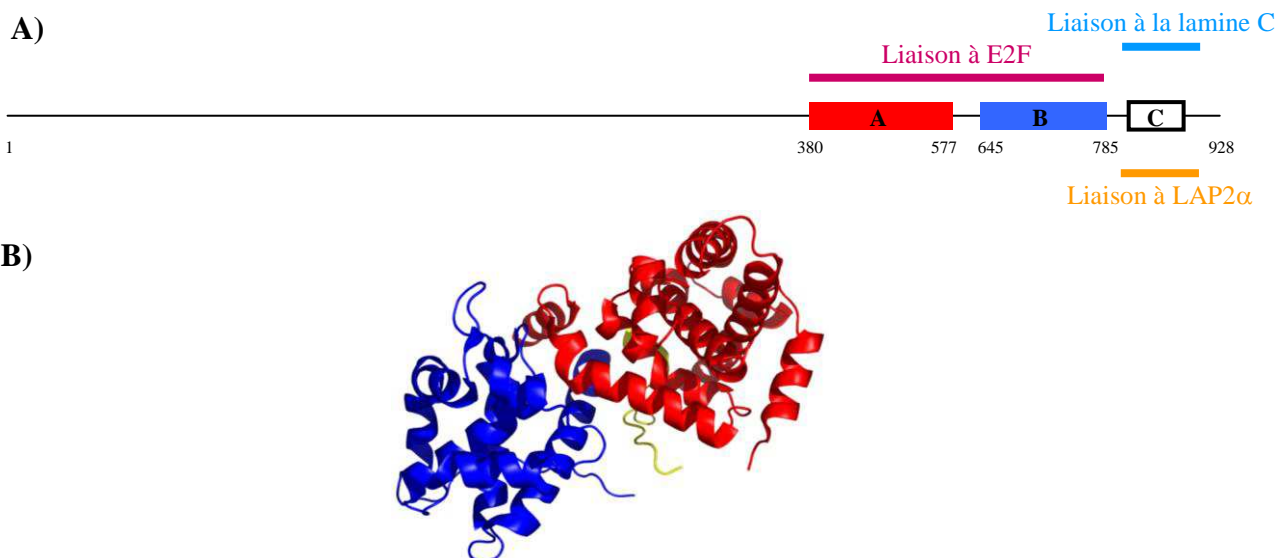


Figure 28: A) Architecture de Rb, montrant l'implication des poches A et B dans l'interaction avec E2F, et celle de la poche C dans l'interaction avec la région 410-615 de LAP2 α (Markiewicz et al., 2002a) et la région 319-572 de la lamine C (Dechat et al., 2000). **B) Structure tridimensionnelle** des

poches A (en rouge) et B (en bleu) de Rb impliquées dans l'interaction avec un peptide C-terminal de E2F (en jaune) (Lee et al., 2002a). Ces deux poches possèdent un repliement en faisceau d'hélices et sont séparées par un segment de 60 résidus absent dans cette étude structurale. Le peptide de E2F possède une conformation étendue et est localisé dans un sillon conservé à l'interface des deux poches de Rb.

Le complexe LAP2 α -lamine-Rb retarde la phosphorylation de Rb et maintient E2F dans un état réprimé (Markiewicz et al., 2002a). Des formes mutantes de Rb n'interagissant pas avec le complexe lamine-LAP2 α (Markiewicz et al., 2002a) et non retenues dans le noyau sont impliquées dans des processus de cancérogenèse (Hinds et al., 1992). Dans les cellules de souris *Lmna*^{-/-}, le niveau de Rb est réduit et Rb est une cible du protéasome (Johnson et al., 2004). De plus, les fibroblastes présentent des caractéristiques de croissance et de taille typiques des fibroblastes de souris *Rb*^{-/-}. Donc, l'interaction lamine de type A-Rb semble bien empêcher la destruction de Rb par le protéasome, régulant ainsi la croissance et la division cellulaire.

L'équipe de R. Foisner a montré que la surexpression de LAP2 α dans les fibroblastes réduit la prolifération, inhibe la progression de la phase G1 à la phase S et est impliquée *in vitro* dans les phases préliminaires de la différenciation des adipocytes (Dorner et al., 2006). Cette équipe a aussi montré que la fonction de régulation de la différenciation de LAP2 α requiert Rb et implique une régulation de l'activité des facteurs de transcription E2F. Elle suggère que les complexes LAP2 α -lamine A/C sont des cofacteurs essentiels de Rb pour le maintien d'une balance entre la prolifération et la différenciation des cellules souches adultes.

Récemment, l'équipe de B. Buendia a généré des lignées de myoblastes surexprimant la lamine A avec des mutations EDMD (Favreau et al., 2004). Ces cellules ne peuvent pas se différencier en myocytes et sont incapables d'arrêter complètement leur prolifération, du fait d'un défaut de l'activité de Rb. De plus, un facteur de transcription intervenant dans la myogenèse, MyoD, qui appartient à la famille structurale des bHLH (basic-helix-loop-helix), ne peut plus fonctionner correctement puisqu'il n'est pas capable d'activer efficacement son gène cible (Favreau et al., 2004). Une étude récente montre une interaction entre MyoD et la lamine A (Bakay et al., 2006). Ces résultats suggèrent que les mutations dans la lamine A/C causant l'EDMD peuvent altérer les interactions entre Rb, MyoD et les lamines.

B. Les lamines de type A et SREBP1

SREBP1 est un facteur de transcription intervenant dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et le métabolisme des acides gras (Kim and Spiegelman, 1996; Tontonoz et al., 1993; Yokoyama et al., 1993). Il appartient à la famille structurale des bHLH-Zip (basic-helix-loop-helix-leucine zipper), et se différencie de

la plupart des membres de cette famille par l'expression d'un précurseur ancré au réticulum endoplasmique. La région N-terminale de ce précurseur est clivée puis importée dans le noyau, où elle régule la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. La structure tridimensionnelle du fragment 320-405 de liaison à l'ADN a été résolue par cristallographie, en complexe avec l'une de ses séquences d'ADN cibles (figure 29) (Parraga et al., 1998).

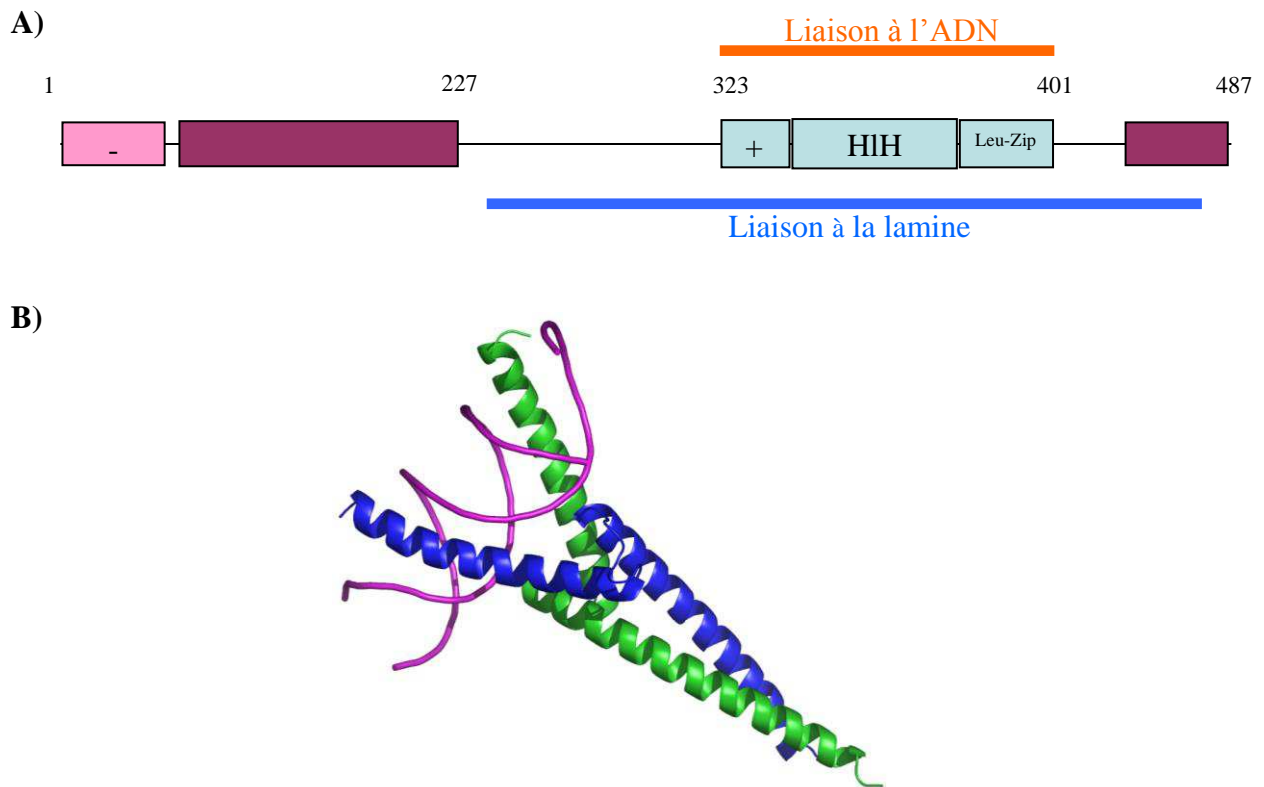


Figure 29: A) Représentation schématique de la région N-terminale de SREBP1a qui rentre dans le noyau. Les différents domaines de cette région sont représentés ainsi que leurs rôles biologiques. En rose, le domaine acide N-terminal, en violet, les domaines riches en proline et sérine et en bleu clair, le domaine de liaison à l'ADN contenant une partie acide suivi d'un motif bHLH-Zip. **B) Structure tridimensionnelle du dimère du motif bHLH-Zip de SREBP1 avec l'une de ses séquences d'ADN cibles** (Parraga et al., 1998). En mauve est représenté le brin d'ADN.

L'équipe de S. Shackleton a montré *in vivo* et *in vitro* que SREBP1 est capable d'interagir avec la région 389-664 de la prélamine A, notamment par son fragment 227-487, qui contient le motif bHLH-Zip de liaison à l'ADN (Lloyd et al., 2002). De plus, cette interaction est déstabilisée quand des mutants FPLD ou EDMD-AD de la prélamine A sont utilisés pour réaliser l'expérience. L'équipe de G. Lattanzi a montré que la prélamine A était accumulée à l'enveloppe nucléaire dans certaines cellules de patients atteints de lipodystrophie (Capanni et al., 2005). La prélamine A ainsi accumulée séquestrerait SREBP1 à la membrane ce qui diminuerait le taux de SREBP1 disponible dans le noyau et causerait une détérioration de la différenciation adipocytaire.

2. LAP2 β sert d'intermédiaire à la répression des gènes

LAP2 β est une protéine ancrée à la membrane interne du noyau qui lie les lamines de type B. Elle interagit aussi avec un régulateur ubiquitaire transcriptionnel connu, GCL, localisé préférentiellement à proximité de la membrane nucléaire interne (Nili et al., 2001). GCL lie et inhibe ensuite la sous-unité de l'activateur de la transcription E2F-DP3. Après transfection par le gène dépendant d'E2F-DP3, les cellules surexpriment LAP2 β et GCL, et répriment ce gène aussi efficacement que Rb. De plus, l'équipe de G. Rechavi a montré que la surexpression de LAP2 β seule est suffisante pour réprimer le gène dépendant de E2F-DP3, ce qui fournit une preuve de la régulation des gènes par une protéine à domaine LEM (Nili et al., 2001). LAP2 β pourrait similairement recruter d'autres répresseurs de la transcription.

LAP2 β contribue également à l'initiation de la réplication de l'ADN. En effet, LAP2 β interagit avec HA95 et ce complexe stabilise Cdc6 (Cell-division-cycle protein-6), un composant important des complexes de pré-réplication (Martins et al., 2003).

3. L'émerine interagit avec des régulateurs de la transcription

L'émerine est ancrée à la membrane interne du noyau par sa partie C-terminale. GCL co-précipite avec l'émerine d'extraits de cellules HeLa et lie aussi l'émerine directement *in vitro* avec une affinité de 30 nM (Holaska et al., 2003). Les sites de liaison pour GCL ont été identifiés dans deux régions de l'émerine qui sont déjà impliquées dans la liaison à une protéine de la chromatine, BAF, et à la lamine A (Holaska et al., 2003; Lee et al., 2001). Des expériences de compétitions ont montré que l'émerine forme des complexes ternaires stables avec la lamine A et BAF ou la lamine A et GCL. En revanche, l'émerine ne lie pas en même temps BAF et GCL. La concentration estimée de BAF à l'enveloppe nucléaire doit être suffisante pour inhiber la liaison de GCL à l'émerine *in vivo*.

L'émerine lie aussi directement deux autres protéines impliquées dans l'expression des gènes : YT521-B (Wilkinson et al., 2003) et Btf (Haraguchi et al., 2004) qui ont été identifiées dans des cribles de double hybride, en utilisant l'émerine entière comme proie. YT521-B est impliquée dans le choix des sites pour l'épissage alternatif, et l'émerine influence la sélection des sites d'épissage par YT521-B *in vivo*. Btf est un répresseur de la transcription qui induit la mort cellulaire quand il est surexprimé. L'émerine séquestrerait Btf et donc supprimerait l'apoptose. L'émerine n'est pas clivée pendant l'apoptose ni dans *C. elegans*, ni dans les cellules de mammifères, mais elle est clivée pendant l'apoptose dans les myoblastes de souris en prolifération et dans les myotubules (Columbaro et al., 2001). On ne

comprend pas encore pourquoi l'émerine est spécifiquement visée par la dégradation apoptotique dans les cellules musculaires, et cette question requière d'autres investigations car la perte des muscles dans l'EDMD pourrait résulter de l'apoptose.

La découverte que l'émerine interagit avec plusieurs régulateurs de la transcription et des facteurs de l'épissage implique qu'elle doit réguler la transcription, directement ou indirectement. Les profils d'expression des gènes de fibroblastes de patients atteints d'EDMD-X et de fibroblastes contrôles ont été comparés. Environ 60 gènes sont affectés dans les patients atteints d'EDMD-X, et dans la plupart des cas leur expression est anormalement augmentée. Un taux d'expression normale est restauré pour 28 de ces gènes en exprimant la forme sauvage de l'émerine dans les cellules de sujets atteints d'EDMD-X. Les gènes « sauvés » dans cette expérience incluent ceux qui codent pour la lamine A/C, la spectrine α II, la filamine qui lie l'actine, la chaîne légère de la myosine et la phosphatase 2A (Tsukahara et al., 2002). Il faudrait maintenant continuer à explorer et à tester les modèles d'expression de ces gènes afin de connaître le mécanisme de la maladie de l'EDMD ainsi que la fonction de l'émerine.

4. MAN1, les lamines et les R-Smads : rôle de l'enveloppe nucléaire dans la transduction du signal

A. Rappels sur les protéines R-Smads

Les protéines R-Smads appartiennent à la voie de signalisation de TGF- β . Les protéines TGF- β et les membres de cette famille (les nodales, les activines, les BMPs (bone morphogenetic proteins), les myostatines, les AMH (anti-Muellerian hormone) et autres) influencent la division cellulaire, la différenciation, l'adhésion, l'organisation et la mort des cellules. Ils ont un rôle critique pendant l'embryogenèse et dans le maintien du tissu pendant la vie adulte. La dérégulation de cette voie de signalisation entraîne de multiples problèmes dans le développement et plusieurs pathologies humaines, telles que des cancers, des fibroses et des maladies auto-immunes. Ces protéines agissent toutes selon le même mode d'action (figure 30) :

- ❖ L'un des ligands de la superfamille de TGF- β se lie à l'un des récepteurs à activité sérine-thréonine kinase à la membrane plasmique, ce qui provoque l'hétérodimérisation non-covalente des récepteurs de type 1 par le type 2.
- ❖ Le récepteur de type 1 phosphoryle ensuite un facteur de transcription R-Smad, spécifique du ligand, qui s'associe à une molécule Co-Smad (Smad4) pour pénétrer dans le noyau.

- ❖ Ce complexe R-Smad/Co-Smad pénètre dans le noyau et stimule l'expression de gènes spécifiques.

La régulation transcriptionnelle des gènes cibles par les ligands de la famille de TGF- β conduit à la régulation de la différenciation et de la prolifération cellulaire (Shi and Massague, 2003).

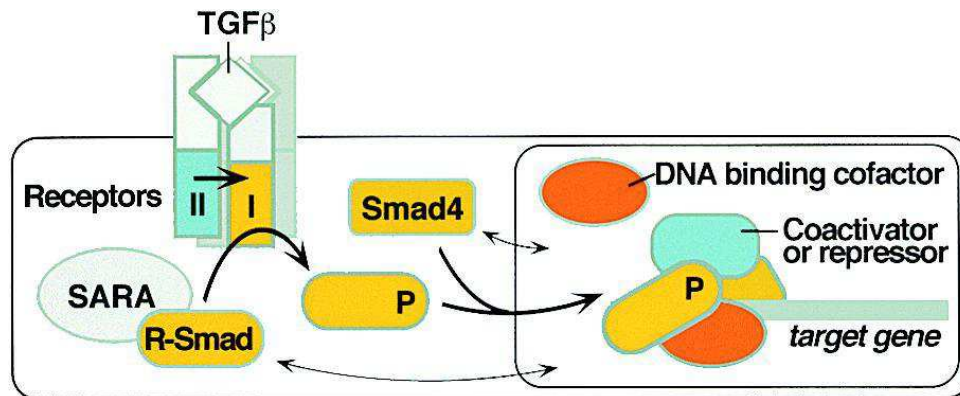


Figure 30 : Représentation schématique de la voie de signalisation de TGF- β
(Massague et al., 2000).

Les protéines Smads sont classées en 3 catégories : il y a les R-Smads ou Smads inductibles (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 et Smad8), les Co-Smads ou Smads coactivatrices (Smad4) et les I-Smads ou Smads inhibitrices (Smad6 et Smad7). Les I-Smads bloquent soit le récepteur soit les R-Smads lorsque ces protéines sont activées. Les protéines R-Smads et Co-Smads possèdent environ 500 résidus organisés en deux domaines structuraux reliés par une région charnière riche en proline (figure 31). Le premier domaine, dit MH1 (*Mad Homology 1*), est responsable de la liaison à l'ADN. Le deuxième domaine, dit MH2 (*Mad Homology 2*), possède un repliement de type FHA (Forkhead associated) trouvé chez les protéines liant des phosphopeptides (Wu et al., 2001). En l'absence de stimulation par des ligands extracellulaires, l'interaction entre les domaines MH1 et MH2 maintient les protéines Smads dans leur état inactif. Après phosphorylation, le domaine MH2 est responsable de l'association des Smads en homotrimère. Il permet aussi l'association des R-Smads avec les Co-Smads. Enfin, la liaison des Smads avec des facteurs de transcription cibles se fait principalement par ce même domaine MH2.

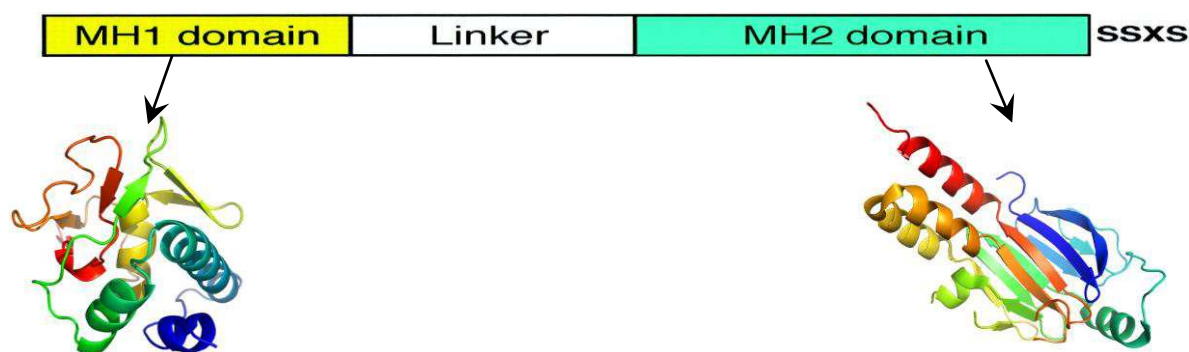


Figure 31 : Représentation schématique des domaines fonctionnels des protéines Smads. Les domaines MH1 et MH2 sont conservés dans toutes les protéines R-Smads et co-Smads et forment des structures globulaires. Ces domaines sont liés par une région beaucoup plus divergente.

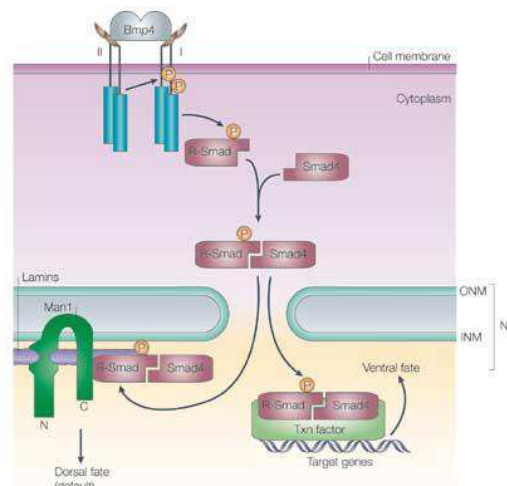
B. Lamines et Smads

Quelques données génétiques récentes sur les souris suggèrent que les lamines de type A pourraient jouer un rôle dans la régulation de la voie de signalisation TGF β en intervenant sur l'état de modification des protéines R-Smads. Les souris sans gène *Lmna*, qui n'expriment pas les lamines de type A, développent des cardiomyopathies et des anomalies dans la région des muscles squelettiques qui ressemblent à l'EDMD humaine (Sullivan et al., 1999). En utilisant des fibroblastes d'embryon de souris *Lmna*^{-/-} et des contrôles sauvages, l'équipe de C.J. Hutchison a obtenu des données impliquant les lamines de type A dans la régulation de la phosphorylation et la déphosphorylation des R-Smads (Van Berlo et al., 2005). En absence des lamines de type A, les cinétiques de phosphorylation de certaines R-Smads, induites par TGF- β , sont altérées, avec une phosphorylation se produisant plus rapidement et qui se dissipe plus vite. Cette équipe a aussi obtenu des preuves que les lamines de type A interagissent avec la phosphatase PP2A et conclut que les lamines régulent l'activité de déphosphorylation de cette enzyme sur les R-Smads (Van Berlo et al., 2005).

L'équipe de G. Bonne a aussi montré que l'introduction d'une homozygotie H222P chez une souris, mutation qui cause une EDMD à l'état hétérozygote chez l'homme, provoque une maladie des muscles squelettique et cardiaque (Arimura et al., 2005). L'analyse histopathologique de la souris révèle une dégénérescence des muscles avec des fibroses associées, une dislocation de l'hétérochromatine, et une activation de la signalisation des Smads dans le cœur et les muscles squelettiques. Cette observation suggère que des mutations dans les lamines de type A qui causent des maladies des muscles striés pourraient affecter l'activité des R-Smads. Cependant, l'activation des R-Smads pourrait être un effet secondaire dans ces souris, comme il a aussi été observé dans d'autres formes de dystrophie musculaire et de cardiomyopathie (Bernasconi et al., 1999; Rosenkranz, 2004).

C. MAN1 dans la transduction du signal

Comme l'émerine, MAN1 interagit avec le facteur de transcription GCL et le répresseur transcriptionnel de l'apoptose Btf (Mansharamani and Wilson, 2005). De plus, il a été montré chez les mammifères et le xénope que MAN1 lie les protéines R-Smads (figure 32) (Lin et al., 2005; Osada et al., 2003; Pan et al., 2005; Raju et al., 2003). Je détaillerai ici cette interaction sur laquelle porte une partie importante de mon travail de thèse.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 32 : MAN1 réprime la voie de signalisation de Bmp4 dans les embryons de *Xenopus laevis* (Gruenbaum et al., 2005).

Il existe plusieurs régulateurs positifs ou négatifs des protéines Smads. Des exemples bien étudiés de régulateurs négatifs sont Sno et Ski (Luo, 2004). Des études convergentes de laboratoires indépendants utilisant des approches différentes ont montré que MAN1 est un régulateur négatif de cette voie de signalisation de par son interaction avec Smad1, Smad2 et Smad3. Ces travaux ont ainsi établi que la membrane nucléaire interne est un nouveau site de régulation de la transduction du signal.

L'une des preuves montrant que MAN1 est impliqué dans la transduction du signal par l'intermédiaire des Smads provient d'une recherche sur les protéines interagissant avec MAN1. L'équipe de H.J. Worman a effectué des cribles de double hybride avec les régions C-terminale et N-terminale nucléoplasmiques de MAN1 (Lin et al., 2005). Alors que les cribles avec la région N-terminale n'ont pas permis d'identifier un partenaire spécifique, les cribles avec la région C-terminale ont permis d'obtenir des clones d'ADNc qui codent pour Smad2. Les expériences de liaison *in vitro* et les essais d'interaction directe par double hybride ont montré que la région C-terminale de MAN1 lie le domaine MH2 de Smad2 et Smad3. L'« antisérum MAN » a aussi co-immunoprécipité Smad2 à partir d'extraits cellulaires, démontrant une interaction *in vivo*. La surexpression de MAN1 dans les cellules inhibe

l'activation de la réponse de TGF- β auprès des gènes cibles et bloque l'arrêt de la prolifération induite par TGF- β . Ces résultats présentent MAN1 comme un régulateur négatif de Smad2 et Smad3.

Des recherches visant à découvrir de nouvelles protéines qui interagissent avec les Smads ont aussi fourni des preuves que MAN1 est un inhibiteur de l'activité de ces protéines. L'équipe de H.C. Huang a effectué un crible de double hybride utilisant Smad1 de Xénope comme proie et identifié ainsi l'orthologue de MAN1 chez cet organisme, lequel se nomme SANE pour Smad1 Antagonistic Effector (Raju et al., 2003). La région C-terminale de cette protéine de Xénope se lie au domaine MH2 de Smad1. De plus, la surexpression de SANE bloque la voie de signalisation de BMP/Smad1 dans les embryons de Xénope et dans un modèle mammifère de formation de l'os. En parallèle, une autre équipe a aussi identifié un homologue de MAN1 chez le Xénope, XMAN1 (Osada et al., 2003). Cette protéine lie Smad1, 5 et 8, bloque la voie de signalisation de BMP et neutralise la formation de l'ectoderme dans le développement du Xénope. Cette même équipe a montré que la neutralisation de l'ectoderme et le blocage de l'activité de BMP dépendent de la région C-terminale de XMAN1. Enfin, une autre équipe a identifié MAN1 en utilisant des expériences de chromatographie d'affinité pour trouver des protéines qui se lient à Smad3 de mammifères (Pan et al., 2005). Elle a montré que le domaine C-terminal de MAN1 s'associe avec les domaines MH2 des protéines Smad1, Smad2 et Smad3 mais pas avec Smad4. Dans leurs expériences, la surexpression de MAN1 inhibe la phosphorylation de Smad1, 2 et 3, leur hétérodimérisation avec Smad4 et leur pénétration dans le noyau. De plus, MAN1 réprime l'activation transcriptionnelle de TGF- β , de BMP et de l'activine sur des gènes spécifiques.

Une preuve additionnelle que MAN1 est un régulateur négatif de la voie de signalisation de TGF- β et de BMP vient d'une étude de clonage positionnel visant à identifier le gène responsable de l'ostéopoikilose, du syndrome de Buschke-Ollendorff et de la mélorhéostose héréditaire non sporadique (Hellemans et al., 2004). Des mutations dans MAN1 provoquant la délétion de la région C-terminale nucléoplasmique sont responsables de ces pathologies. L'équipe de G.R. Mortier a aussi montré qu'en l'absence de mutation, MAN1 interagissait avec les protéines Smads et bloquait les deux voies de signalisation de TGF- β et de BMP dans les cellules humaines. En revanche, les cellules des sujets humains avec les mutations dans MAN1 montrent une expression amplifiée des gènes activés par TGF- β et BMP, ce qui provoque des lésions des os et quelquefois des anomalies des tissus de soutien. Le blocage de la signalisation de TGF- β et BMP par MAN1 résulte probablement de la séquestration par MAN1 de Smad1, 2 et 3 à la membrane nucléaire interne. Cependant, certains résultats suggèrent que MAN1 pourrait jouer un rôle beaucoup plus complexe,

bloquant la phosphorylation de Smad ou induisant sa déphosphorylation, en changeant sa localisation. Tandis que des études futures apporteront des données supplémentaires sur le blocage de la signalisation dépendante des Smads par MAN1, les résultats jusqu'ici démontrent clairement que la membrane nucléaire interne est un site subcellulaire où la transduction du signal est régulée.

Chapitre 2 : Analyse de la région C-terminale nucléoplasmique de MAN1 humaine

I. Introduction

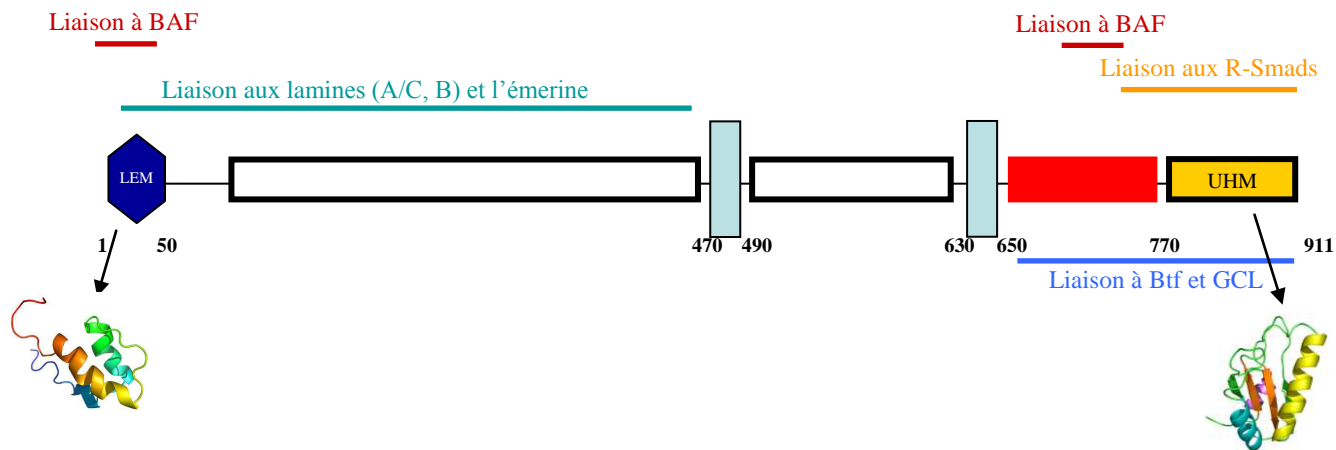
Nous avons précédemment décrit les données suggérant que l'enveloppe nucléaire joue un rôle important dans la régulation de l'expression de certains gènes. Cependant, aucune donnée structurale n'existe sur des complexes comprenant des protéines de l'enveloppe nucléaire et des régulateurs de la transcription, alors que de telles structures nous paraissent être des supports indispensables à la compréhension des mécanismes moléculaires médiés par ces interactions. Lors de ma thèse, j'ai abordé cet aspect structural de la caractérisation du rôle des protéines de l'enveloppe nucléaire dans la régulation de l'expression des gènes. Dans ce chapitre, je présente mes travaux sur l'analyse de la structure tridimensionnelle de la région nucléoplasmique C-terminale de la protéine humaine MAN1, ancrée à la membrane interne du noyau. Cette étude a été réalisée avec l'objectif d'identifier les déterminants moléculaires des interactions entre MAN1 et les protéines R-Smads, régulateurs transcriptionnels appartenant à la voie de signalisation TGF β . Pour cette étude, nous avons collaboré avec le groupe d'Howard J. Worman à Columbia University, New York, qui a été l'un des premiers à publier ces interactions MAN1/R-Smads (Lin et al., 2005). Avec cette équipe, nous avons tenté d'exprimer plusieurs fragments de la région nucléoplasmique C-terminale de MAN1. Puis nous avons caractérisé la structure tridimensionnelle en solution de deux de ces fragments. Nos résultats ont suggéré que ces fragments pourraient interagir directement avec l'ADN. Nous avons testé ces interactions, et nous avons cherché à comprendre si MAN1 pouvait simultanément lier l'ADN et les protéines R-Smads. La caractérisation structurale du complexe ternaire MAN1/R-Smad/ADN en cours au laboratoire devrait permettre d'avancer de manière significative dans la compréhension du rôle biologique de MAN1.

La région nucléoplasmique C-terminale de MAN1 (résidus 655-911) est très bien conservée chez les eucaryotes supérieurs (~72% d'identité entre toutes les séquences disponibles). Cette région est riche en résidus hydrophobes et peut être décomposée en deux parties prédites comme globulaires. La première partie, que nous avons nommée MAN1C^A, est située entre les résidus 655 et 775. Elle est responsable de la liaison de MAN1 à la protéine BAF, qui lie l'ADN, certaines histones, et intervient dans l'intégration des génomes viraux à l'ADN de la cellule hôte (Segura-Totten and Wilson, 2004). Elle fait aussi partie de la région impliquée dans l'interaction de MAN1 avec les facteurs de transcription GCL et Btf

(Mansharamani and Wilson, 2005) et les régulateurs de la transcription R-Smads (Lin et al., 2005). Au cours de ma thèse, il a été proposé à partir de l'analyse de la séquence de MAN1 par bioinformatique que cette partie adopte un repliement de type Winged Helix (Mans et al., 2004). La deuxième partie de la région nucléoplasmique C-terminale de MAN1, que nous avons nommée UHM, est située entre les résidus 776 et 911. Elle est aussi impliquée dans les interactions avec GCL, Btf et plusieurs R-Smads (figure 33A). Sa structure tridimensionnelle a été prédite récemment par bioinformatique (Kielkopf et al., 2004). Cette partie est supposée se replier comme un domaine RRM, mais elle ne possède pas le motif de liaison à l'ARN des domaines RRM. En revanche, elle est analogue à un domaine des protéines U2AF qui interagissent avec des partenaires protéiques, ce qui la classe dans les domaines de type RRM dits UHM (U2AF Homology Motif, figure 33A et B).

Dans ce chapitre, je présenterai les articles publiés dans *J. Bio. NMR* et *J. Biol. Chem.* où sont réunis la plupart des résultats obtenus sur la région nucléoplasmique C-terminale de MAN1, ainsi que des expériences complémentaires renforçant les conclusions de ces articles. Ensuite, je développerai les résultats préliminaires obtenus sur la purification du domaine MH2 des protéines R-Smads.

A-



B-

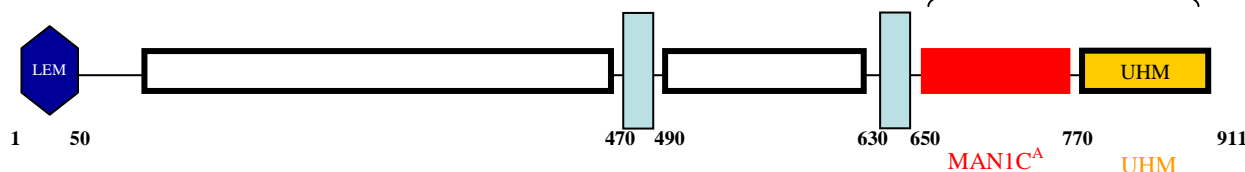


Figure 33: Schémas récapitulatifs A- des rôles biologiques des différentes régions de MAN1, **B-** des constructions étudiées dans ce travail.

II. Caractérisation structurale de la région C-terminale de MAN1

1. Résultats préliminaires non publiés

A. Le premier domaine est replié d'après le Dichroïsme Circulaire

En préliminaire d'une étude structurale plus poussée, nous avons enregistré des spectres de dichroïsme circulaire sur le premier domaine C-terminal de MAN1. Par cette méthode, nous avons pu vérifier l'état de repliement de MAN1C^A avec peu de protéine et identifier les premiers éléments de structure secondaire de ce domaine.

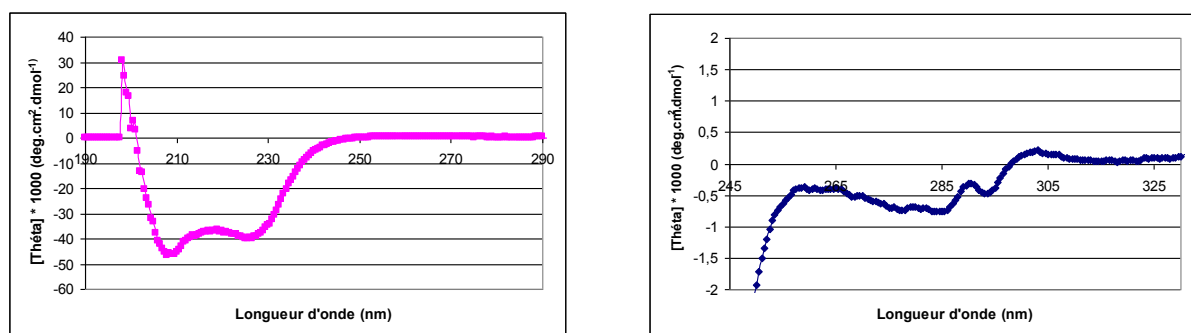


Figure 34 : Spectre enregistré en dichroïsme circulaire de MAN1C^A. En rose, spectre enregistré dans la région des UV lointains avec 20 μM de MAN1C^A (cuve de 1 cm) et en bleu, spectre enregistré dans la région des UV proches avec 80 μM de MAN1C^A (cuve de 1 cm).

Nous avons enregistré des spectres à deux concentrations différentes afin d'obtenir des informations sur les deux régions spectrales d'intérêt (figure 34). Le spectre enregistré dans les UV lointains (en rose) correspond à un profil d'hélice α et de feuillet β mélangés. Dans les UV proches (en bleu), nous observons un signal correspondant à une structuration autour des aromatiques de MAN1C^A.

B. L'ensemble de la région C-terminale contient un seul domaine structuré

Pour aller plus loin dans la caractérisation structurale de la région C-terminale de MAN1, nous avons enregistré des spectres 1D ^1H RMN sur MAN1C^A et MAN1C^B.

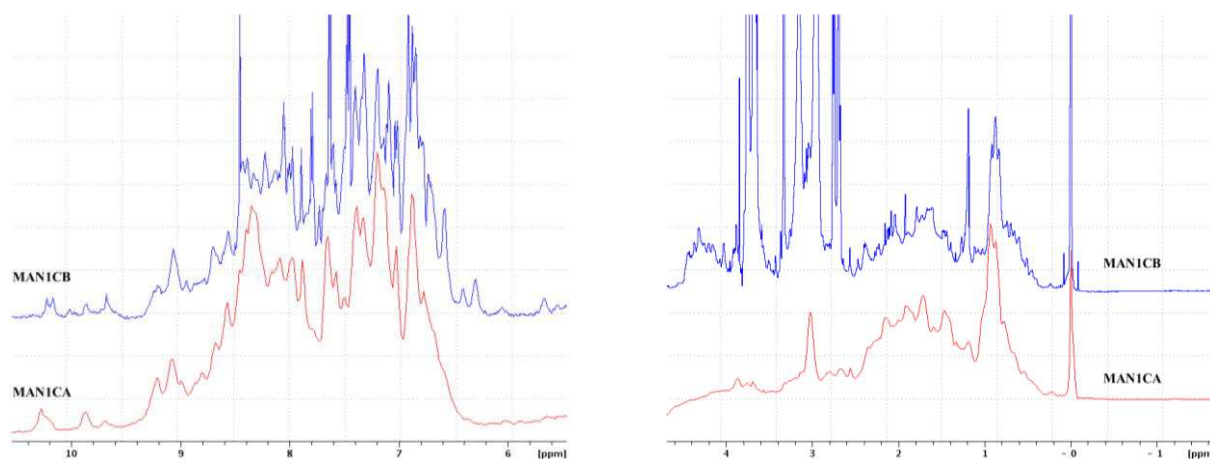


Figure 35 : Spectre 1D ^1H RMN de MAN1C^A (en rouge) et MAN1C^B (en bleu) enregistrés à 23°C à 600 Mhz.

Le spectre 1D ^1H RMN de MAN1C^B présente un aspect général similaire à celui de MAN1C^A avec des pics supplémentaires répartis sur tout le spectre et pas de manière prépondérante dans la région correspondant à une chaîne peptidique déstructurée (figure 35). On peut donc penser que le domaine UHM n'est pas déstructuré.

Nous avons ensuite enregistré des spectres 1D ^1H RMN de MAN1C^B à différentes températures afin d'observer l'effet de la température sur notre domaine (figure 36).

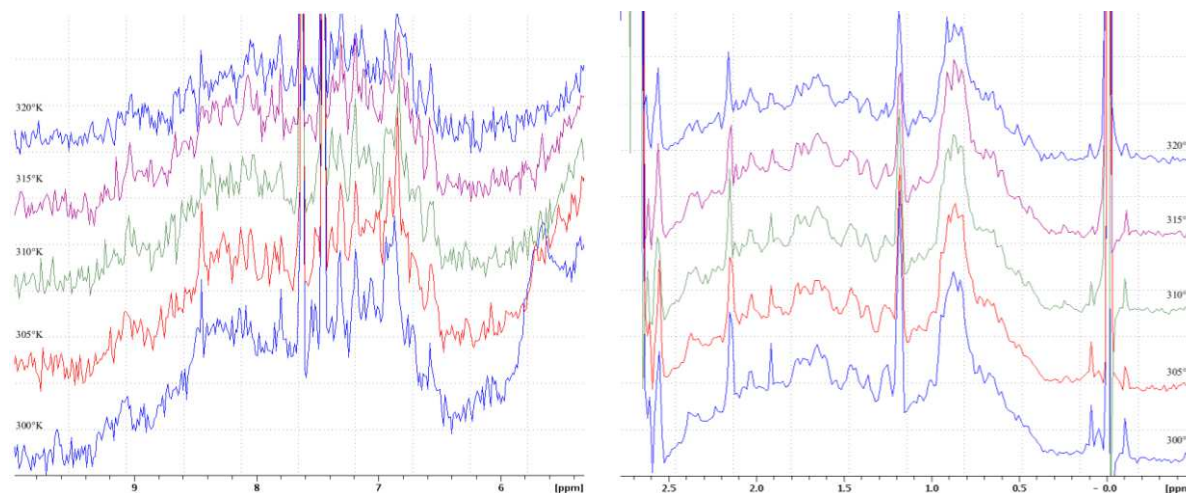


Figure 36 : Spectre 1D ^1H RMN de MAN1C^B enregistrés à différentes températures à 600 Mhz.

A partir de ces spectres, nous avons conclu que la structure tridimensionnelle de MAN1C^B était semblable entre 27°C (300°K) et 42°C (315°K), mais était déstabilisée après 42°C (315°K).

2. Articles publiés

A. *The carboxyl-terminal nucleoplasmic region of MAN1 exhibits a DNA binding winged helix domain.*

Lorsque nous superposons les spectres ^1H - ^{15}N HSQC de MAN1C^A (655-775) et MAN1C^B (658-910), nous retrouvons tous les pics de MAN1C^A sur le spectre de MAN1C^B. Ceci montre que l'environnement chimique des résidus de MAN1C^A n'est aucunement modifié par l'introduction du domaine UHM, donc qu'il n'y a pas d'interaction entre ces deux domaines. Nous observons aussi une quarantaine de pics supplémentaires correspondants au deuxième domaine alors que celui-ci contient 134 résidus. Ce manque de signaux pourrait être dû à un dépliement partiel ou à un processus d'échange conformationnel. Cependant les spectres 1D ^1H RMN de MAN1C^A et MAN1C^B sont similaires, ce qui suggère que MAN1C^B ne possède pas une large partie déstructurée propre. Nous proposons plutôt que le deuxième domaine n'adopte pas de structure tertiaire stable, mais une structure fluctuant sur une échelle de temps de l'ordre de la milliseconde. Dans la littérature, seulement trois structures tridimensionnelles de domaines UHM ont été résolues. Deux de ces domaines, U2AF³⁵ et TgDRE, ne sont pas stables en solution. Le domaine UHM de U2AF³⁵ est déplié lorsqu'il est seul, et celui de TgDRE s'agrège rapidement au cours de l'enregistrement des expériences RMN (Frenal et al., 2006; Kellenberger et al., 2002). La troisième structure disponible est celle du domaine UHM de la protéine U2AF⁶⁵ en complexe avec un ligand mais aucune donnée sur la stabilité de la protéine seule en solution n'est présentée (Selenko et al., 2003). On peut donc penser que la structuration ainsi que la stabilité des domaines UHM dépendent en général de leur liaison avec un partenaire biologique.

Nous avons ensuite résolu la structure tridimensionnelle de MAN1C^A humain, à partir de données de RMN et de calculs de modélisation moléculaire. Ce domaine se replie suivant un motif structural nommé « Winged Helix » (hélice ailée), qui sera noté WH par la suite. Le motif Winged Helix est une sous-classe de la superfamille des domaines « hélice-coude-hélice » de liaison à l'ADN (Gajiwala and Burley, 2000). Il est retrouvé chez les organismes procaryotes et eucaryotes et sa structure tridimensionnelle a été caractérisée pour la première fois en 1993, chez le facteur de transcription HNF-3 (Clark et al., 1993). La topologie canonique d'un domaine WH est de la forme H1-S1-H2-T-H3-S2-W1-S3-W2 où S1, S2 et S3 forment un feuillet β antiparallèle situé en périphérie du motif « hélice-coude-hélice » H2-T-H3. W1 et W2 sont deux boucles dont la disposition autour de l'hélice H3 évoque les ailes d'un papillon, ce qui explique le nom de Winged Helix.

Les domaines WH sont connus pour interagir avec l'ADN par l'hélice de reconnaissance H3. Nous avons montré une interaction avec l'ADN par retard sur gel pour MAN1C^A mais aussi pour MAN1C^B. MAN1C^B présente une plus forte affinité apparente (d'un facteur 3) pour l'ADN que MAN1C^A. Le calcul du potentiel électrostatique du domaine WH de MAN1 montre que l'hélice de reconnaissance est fortement chargée positivement. Cette hélice présente trois séquences d'acides aminés arginine ou lysine. Nous avons aligné les hélices H3 des différents WH dont la structure tridimensionnelle en complexe avec l'ADN a été résolue par cristallographie, afin de repérer les motifs de reconnaissance à l'ADN communs. L'interaction WH-ADN implique principalement une arginine centrale dans l'hélice de reconnaissance, encadrée de part et d'autre de résidus hydrophobes puis de résidus hydrophiles. Afin de déterminer si cette arginine ou/et les autres séquences d'acides aminés chargés positivement étaient impliquées dans l'interaction de MAN1 avec l'ADN, nous avons muté ces différentes séquences dans MAN1C^A et MAN1C^B et réalisé des gels retards avec ces mutants. Un seul des mutants de MAN1C^B présente encore de l'affinité pour l'ADN, tous les autres mutants ont perdu leur interaction pour l'ADN, lorsque ces interactions sont visualisées par retard sur gel.

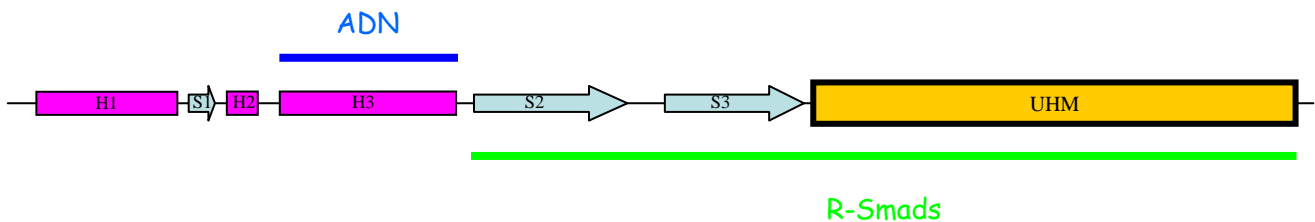


Figure 37: Schéma de MAN1C^B avec les détails topologiques de MAN1C^A et les différentes interactions connues. H : hélice, S : brin, UHM : U2AF homology motif.

En conclusion, MAN1 interagit avec l'ADN par son hélice de reconnaissance H3. L'équipe de H.J. Worman a montré que l'interaction entre MAN1 et le domaine MH2 des protéines R-Smads implique le domaine UHM de MAN1, le linker entre le domaine UHM et le WH et les deux derniers brins du WH, mais en aucun cas l'hélice H3 (figure 37). MAN1 pourrait donc interagir à la fois avec l'ADN et avec les R-Smads. Enfin, les protéines R-Smads se lient par leur domaine MH2 à de nombreux facteurs de reconnaissance de l'ADN afin d'acquérir une spécificité de liaison à l'ADN plus importante. Cet article suggère donc que MAN1 pourrait intervenir dans un complexe ternaire avec l'ADN et les R-Smads et ainsi réguler la transcription d'une autre famille de gènes spécifique de MAN1 au travers de la voie de signalisation de TGF- β .

The Carboxyl-terminal Nucleoplasmic Region of MAN1 Exhibits a DNA Binding Winged Helix Domain*

Received for publication, March 1, 2006, and in revised form, April 7, 2006. Published, JBC Papers in Press, April 28, 2006, DOI 10.1074/jbc.M601980200

Sandrine Caputo^{†1}, Joël Couprie^{†1}, Isabelle Duband-Goulet^{§1}, Emilie Kondé[‡], Feng Lin^{¶2}, Sandrine Braud[‡], Muriel Gondry[‡], Bernard Gilquin^{†1}, Howard J. Worman^{¶3}, and Sophie Zinn-Justin^{†1,4}

From the [†]Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines/Direction des Sciences du Vivant, Bâtiment 152, Commissariat à l'Energie Atomique Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France, [§]Institut Jacques Monod-CNRS Unité Mixte de Recherche 7592, Universités Paris 6/7, 2 Place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France, and [‡]Departments of Medicine and of Anatomy and Cell Biology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, New York 10032

MAN1 is an integral protein of the inner nuclear membrane that interacts with nuclear lamins and emerin, thus playing a role in nuclear organization. It also binds to chromatin-associated proteins and transcriptional regulators, including the R-Smads, Smad1, Smad2, and Smad3. Mutations in the human gene encoding MAN1 cause sclerosing bone dysplasias, which sometimes have associated skin abnormalities. At the molecular level, these mutations lead to loss of the MAN1-R-Smads interaction, thus perturbing transforming growth factor β superfamily signaling pathway. As a first step to understanding the physical basis of MAN1 interaction with R-Smads, we here report the structural characterization of the carboxyl-terminal nucleoplasmic region of MAN1, which is responsible for Smad binding. This region exhibits an amino-terminal globular domain adopting a winged helix fold, as found in several Smad-associated sequence-specific DNA binding factors. Consistently, it binds to DNA through the positively charged recognition helix H3 of its winged helix motif. However, it does not show the predicted carboxyl-terminal U2AF homology domain in solution, suggesting that the folding and stability of such a domain in MAN1 depend upon binding to an unidentified partner. Modeling the complex between DNA and the winged helix domain shows that the regions involved in DNA binding are essentially distinct from those reported to be involved in Smad binding. This suggests that MAN1 binds simultaneously to R-Smads and their targeted DNA sequences.

The nuclear envelope separates the nucleus from the cytoplasm in eukaryotic cells. It consists of inner and outer nuclear membranes and nuclear pore complexes. The inner nuclear membrane is closely associated with the underlying chromatin and nuclear lamina. For many years, the nuclear envelope was thought to function mainly as an architectural stabilizer of the nucleus, participating in assembly and disassembly processes during mitosis. However, recent findings demonstrate that nuclear envelope proteins are involved in fundamental nuclear functions, such as chromatin organization and gene expression (1). Inherited

or *de novo* mutations in genes encoding nuclear envelope proteins cause a wide range of human diseases (2). These findings emphasize the importance of understanding the functions of the nuclear envelope in both physiologic and pathologic states.

MAN1 (also known as LEMD3) is a transmembrane protein of the inner nuclear membrane. It was originally identified as an antigen recognized by self-antibodies from the serum of a patient with a collagen vascular disease (3, 4). MAN1 is part of a protein complex essential for chromatin organization and cell division. It is analogous to the yeast protein SRC1, which may play a role in sister chromatid separation (5). In *Xenopus* embryos, overexpressed MAN1 induces the formation of a secondary neural axis by binding directly to the MH2 domain of Smad1, Smad5, or Smad8, thus antagonizing bone morphogenetic protein signaling (6, 7). Similarly, in humans MAN1 binds to the MH2 domain of the R-Smads Smad1, Smad2, and Smad3, which mediate signaling by activin, bone morphogenetic protein, and transforming growth factor β (8, 9). Heterozygous loss-of-function mutations in the human gene encoding MAN1 that disrupt this critical interaction cause sclerosing bone dysplasias characterized by increased bone density and sometimes skin abnormalities (10). Thus, mutations in a ubiquitous nuclear envelope protein give rise to relatively tissue-specific disease phenotypes, suggesting a role for MAN1 in the regulation of tissue-specific gene transcription, as has similarly been proposed for nuclear lamins (11).

Sequence analysis indicates that MAN1 spans the inner nuclear membrane twice, resulting in a protein with amino-terminal and carboxyl-terminal nucleoplasmic domains (4). At its amino terminus, MAN1 contains a LEM domain that is present in several proteins, including the inner nuclear membrane proteins lamina-associated polypeptide 2 and emerin (4, 12–14). This domain interacts with the DNA and chromatin-binding protein Barrier-to-Autointegration Factor (15, 16). The entire amino-terminal nucleoplasmic region of MAN1 also binds to the nuclear intermediate filaments lamin A and lamin B1 and to emerin (17). Thus, it mediates protein-protein interactions through contacts with the chromatin and the nuclear lamina. This domain is also necessary for efficient localization of MAN1 in the inner nuclear membrane (18).

Here we have examined the three-dimensional structure of the carboxyl-terminal nucleoplasmic region of MAN1, which is responsible for the inhibition of physiologically important signaling pathways through an interaction with several R-Smads (8, 9). This region of MAN1 has also been shown to bind to Barrier-to-Autointegration Factor and to the transcriptional regulators GCL and Btf (17). It comprises a first fragment (amino acids 655–758) showing sequence characteristics of a globular domain and a second fragment (amino acids 782–911) predicted to be an RRM-like protein interaction domain named U2AF

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The atomic coordinates and structure factors (code 2CH0) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

The chemical shift assignments reported here have been deposited in the BioMagRes-Bank Database under accession number 6919.

¹ Supported by Grants 8699, 9513, and 11591 from Association Française contre les Myopathies.

² Present address: United Biomedical, Inc., 25 Davids Dr., Hauppauge, NY 11788.

³ Supported by Grant MDA3711 from the Muscular Dystrophy Association.

⁴ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-1-69-08-30-26; Fax: 33-1-69-08-90-71; E-mail: szinn@cea.fr.

MAN1 Carboxyl-terminal Structure

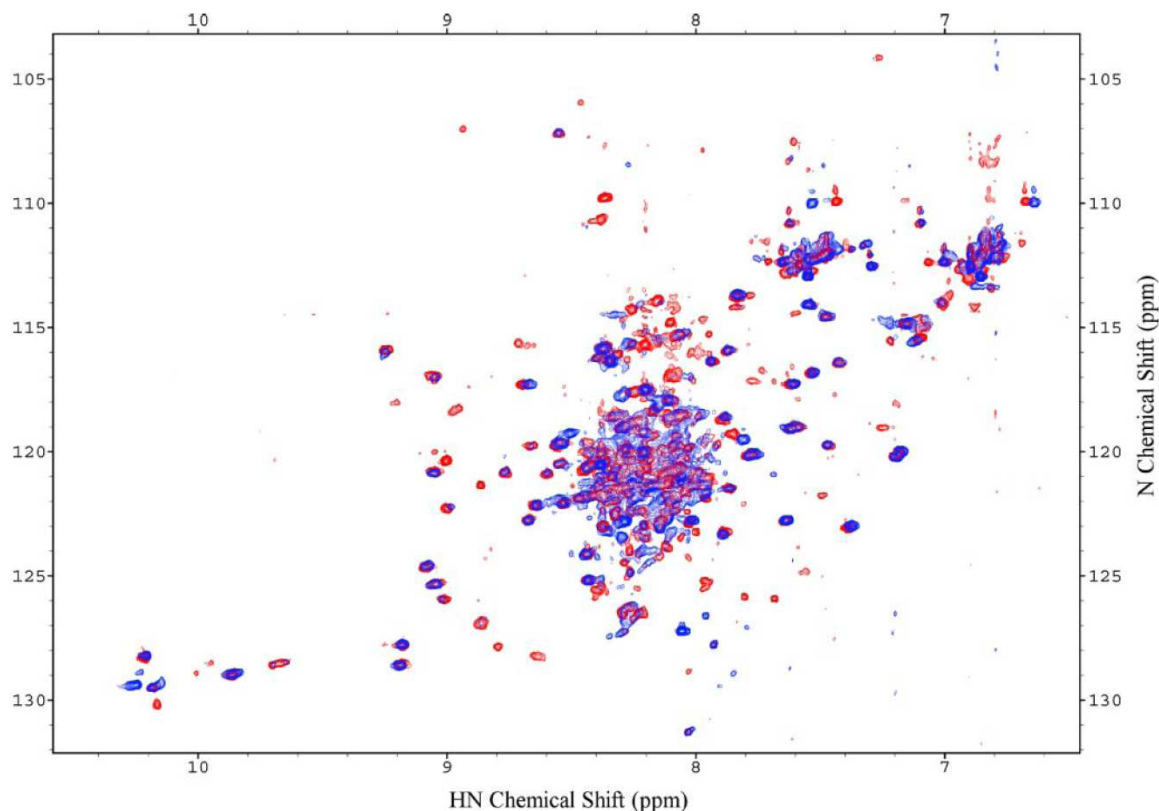


FIGURE 1. Superimposition of ^1H - ^{15}N HSQC spectra of MAN1C^A and MAN1C^B. Overlay of the ^1H - ^{15}N HSQC spectra obtained at 300 K for MAN1C^A (blue) and for MAN1C^B (red). Both protein fragments were prepared in 50 mM phosphate/Tris buffer and 150 mM NaCl at pH 6.0.

homology motif (UHM)⁵ (19). We report that the first globular domain adopts a three-dimensional structure generally found in DNA binding regions of transcription factors. We show that indeed the entire carboxyl-terminal region of MAN1 is involved in DNA binding and propose that this interaction is synergetic to the binding of MAN1 to different transcriptional regulators, particularly R-Smads.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Sample Preparation—All cloning procedures were performed according to standard methods (20). The region from amino acid 655 to amino acid 775 of MAN1 (MAN1C^A) was overexpressed in *Escherichia coli* strain BL21 DE3 pLys S transformed with a construct generated in pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences, Inc.) that encodes glutathione *S*-transferase and a thrombin cleavage site fused to MAN1C^A. The fusion protein was purified using glutathione-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) and cleaved using thrombin protease. Because of the cloning strategy, the peptide resulting from the cleavage comprises additional residues from 1 to 5, MAN1 residues from 6 to 126, and again additional residues from 127 to 133. Uniformly labeled ^{15}N protein was produced in minimum medium M9 containing 1 g·liter⁻¹ of $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Boehringer) as the nitrogen source. Uniformly labeled $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ protein was produced in a rich medium prepared from uniformly labeled $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ *Spirulina maxima* cyanobacteria. The resulting protein was characterized by electrospray ionization mass spectroscopy and amino terminus sequencing. NMR

samples (~0.8 mM) were prepared in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 150 mM NaCl in either 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O or in 100% D_2O , 1 mM EDTA, a protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich), 1 mM Tris(2-chloroethyl) phosphate, and 1 mM NaN_3 . 3-(Trimethylsilyl)[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$] propionate (TSP) was added as a chemical shift reference. ^{13}C and ^{15}N chemical shifts were referenced indirectly to TSP, using the absolute frequency ratios.

The region of MAN1 from amino acid 658 to amino acid 910 (MAN1C^B) was overexpressed in *E. coli* strain BL21 DE3 Star transformed with a plasmid that encodes ZZ fusion, a cleavage site for tobacco etch virus, protease and MAN1C^B (21). It was purified using immunoglobulin IgG-SepharoseTM 6 Fast Flow (Amersham Biosciences) and cleaved using the catalytic domain of tobacco etch virus protease. Uniformly labeled ^{15}N protein was produced in minimum medium M9 containing 1 g·liter⁻¹ of $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Boehringer) as the nitrogen source. The resulting protein was characterized by electrospray ionization mass spectroscopy and amino terminus sequencing. NMR samples of the protein at ~0.5 mM were prepared in 50 mM Tris buffer (pH 6.0) containing 150 mM NaCl in either 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O or in 100% D_2O , 1 mM EDTA, a protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich), 1 mM Tris(2-chloroethyl) phosphate, and 1 mM NaN_3 . TSP was added as a chemical shift reference. ^{15}N chemical shifts were referenced indirectly to TSP, using the absolute frequency ratios. MAN1C^A and MAN1C^B mutants were generated with QuikChange multisite-directed mutagenesis kit (Stratagene) following the manufacturer's instructions.

⁵ The abbreviations used are: UHM, U2AF homology motif; r.m.s.d., root mean square deviation; TSP, 3-(trimethylsilyl)[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$] propionate.

MAN1 Carboxyl-terminal Structure

NMR Spectroscopy—All assignment experiments of MAN1C^A were performed at 30 °C on Bruker DRX-600 or DRX-900 spectrometers equipped with a triple resonance probe according to the previously reported procedure (22). The nuclear Overhauser effect cross-peak volumes used for structure calculation were measured on five NOESY experiments (a ¹⁵N-HSQC-NOESY in H₂O and a ¹³C-HSQC-NOESY in D₂O recorded at 900 MHz with a 100-ms mixing time at the European Large Scale Facilities in Utrecht, Netherlands, a ¹⁵N-HSQC-NOESY in H₂O with a 150-ms mixing time and a ¹³C-HSQC-NOESY in D₂O with a 200-ms mixing time and a ¹³C-HSQC-NOESY in the ¹³C aromatic region with a 200-ms mixing time, all three recorded on a local 600-MHz spectrometer equipped with a triple resonance TXI cryoprobe). ϕ torsion angle values were deduced from the analysis of the Hn-Ha and HMQC-J experiments (23, 24). Hydrogen-bound restraints were derived from slowly exchanging amide protons, identified by measuring the amide proton exchange rates from ¹H-¹⁵N HSQC spectra recorded at different times on a protein sample dissolved in D₂O. All spectra were processed with the programs Xwinnmr (Bruker) or NMRPipe (25) and analyzed using Felix (Accelrys).

Solution Structure Determination—We solved the three-dimensional solution structure of the carboxyl-terminal domain of MAN1C^A using heteronuclear double and triple resonance NMR spectroscopy and molecular modeling. Coordinates and NMR restraints were deposited at the Protein Data Bank. The solution structure was calculated on the basis of the analysis of 3581 nuclear Overhauser effect cross-peaks (765 were picked on the ¹⁵N-HSQC-NOESY 600 MHz, 756 on the ¹⁵N-HSQC-NOESY 900 MHz, 1241 on the ¹³C-HSQC-NOESY 900 MHz, 763 on the ¹³C-HSQC-NOESY 600 MHz, and 56 on the ¹³C-HSQC-NOESY aromatic 600 MHz, respectively). A semiautomated iterative assignment procedure was applied for the assignment and the construction of the three-dimensional structures (26). A force field adapted to NMR structure calculation (file parallhdg.pro in CNS 1.0) (27) was used. On this basis, 1850 restraints were generated. Thus, the mean number of distance restraints/residue yields 19.2 for the segment Arg-6 to Ile-111. Furthermore, 169 couples of (ϕ , ψ) torsion angles were derived either from the backbone ¹H, ¹⁵N, and ¹³C chemical shifts using the program TALOS (28) or from the Hn-Ha and HMQC-J data. Finally, 8 hydrogen bonds were imposed during the structure calculation. At the last step, 1000 structures were calculated and the 20 best structures were selected and refined with a standard energy function (CHARMM22), including an electrostatic energy term. This term was calculated with no net charge on the side-chain atoms and with a distance-gated dielectric constant. Analysis of the 20 final structures showed that no distance violations larger than 0.5 Å were present and that the covalent geometry was respected. The r.m.s.d. around the average structure was 1.0 Å for the backbone and 1.6 Å for the heavy atoms.

DNA Preparation—The 211-base pair DNA fragment was generated by polymerase chain reaction with a thermostable DNA polymerase (Promega) using a PTC-100 PCR System (MJ Research, Inc.). The 211-base pair DNA fragment, obtained from the DraI and BamHI double digest of the plasmid pUC(357.4), was used as template and the 5'-AAATAGCTTAACCTTCATCAAGCAAG-3' and 5'-CCCGGGC-GAGCTCGAATTCC-3' oligonucleotides as sense and antisense primers. 5'-end labeling with [³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase was performed according to standard protocols (20).

Protein-DNA Interactions—Proteins were diluted to the concentrations indicated in the Fig. 5 legend in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, 1 mM Tris(2-chloroethyl) phosphate, 50 mM NaCl, and 0.1% Triton X-100. They were incubated with the radioactive 211-base pair DNA fragment for 3 h

TABLE 1

Structural statistics for the human MAN1 655–775 fragment

The van der Waals energy is calculated with a Lennard-Jones potential. The electrostatic energy is calculated with no net charge on side-chain atoms and a distance-gated dielectric constant. CHARMM22 parameters are used. NOE, nuclear Overhauser effect.

Number of NOE assigned	3581
Number of constraints	
Distance constraints	1811
Dihedral constraints	169
Number of violations	
NOE distance > 0.5 Å	0.1 ± 0.3
Dihedral restraints > 10°	0.05 ± 0.2
R.m.s.d. from idealized covalent geometry	
Bond (Å)	0.018 ± 0.00024
Angle (°)	3.5 ± 0.05
Improper (°)	2.4 ± 0.2
R.m.s.d. on restraints	
Distance (Å)	0.043 ± 0.0016
Dihedral (°)	1.3 ± 0.09
Energy (kcal/mol)	
Van der Waals	182 ± 13
Electrostatic	−379 ± 25
Ramachandran plot (%) (residues 17–101)	
Most favoured region	90.0
Additionally allowed region	9
Coordinate precision (residues 17–101) (Å)	
Backbone	1.0 ± 0.1
Heavy atoms	1.6 ± 0.16

at room temperature. Protein-DNA complexes were analyzed on 5% polyacrylamide gels at an acrylamide to bis-acrylamide ratio of 29/1 (w/w) in 12.5 mM Tris-HCl, pH 8.4, 95 mM glycine, and 0.5 mM EDTA. After 1 h of pre-electrophoresis, samples were loaded onto the gels and resolved by electrophoresis at 70 V for 2 h. DNA was detected by autoradiography of dried polyacrylamide gels at −80 °C using Biomax MR films (Kodak) and an intensifying screen. For affinity measurements, dried polyacrylamide gels were exposed to a phosphor screen, and measurements of the radioactive signals were performed with a STORM 860 scanner (Amersham Biosciences) using ImageQuant software (GE Healthcare).

Molecular Modeling of the MAN1 Winged Helix-DNA Complex—The winged helix domain of MAN1 was superimposed onto the winged helix domain of MecI-DNA complex using the program Sybyl 6.9. The superimposition was done by fitting the C α atoms of the following segments 6–23, 24–25, 26–37, 38–53, 60–64, and 65–68 of MecI on 15–32, 44–45, 46–57, 60–75, 82–86, and 93–96 of MAN1C^A (resulting r.m.s.d. 3.4 Å). These segments correspond to the secondary elements of the winged helix motif. Then, in the MecI-DNA complex, the winged helix domain of MecI was replaced by the corresponding domain of MAN1. To remove the small number of steric clashes, 1000 steps of steepest descents energy minimization were run using the program CHARMM (29). Side-chain conformations were allowed to vary only on the MAN1 winged helix domain, keeping the entire DNA fixed and maintaining the MAN1 winged helix domain backbone by progressively decreasing harmonics constraints. A MAN1 winged helix-DNA complex model with no bad clashes and reasonable interaction energy was thus obtained.

RESULTS

The MAN1 Carboxyl-terminal Nucleoplasmic Region Contains a Well Structured Domain—The carboxyl-terminal nucleoplasmic region of MAN1, comprising residues 655–910, exhibits two potential globular domains. The region from amino acid 655 to 758 is conserved in all MAN1 analogs (called MAN1 and LEM2 proteins) (30) and shows glob-

MAN1 Carboxyl-terminal Structure

ular domain sequence characteristics (31); the region between amino acids 785 and 910 is found only in MAN1 proteins and shows an unusual RRM motif called UHM, predicted to adopt an α/β fold and to be involved in protein recognition (19). We have recorded the ^1H - ^{15}N HSQC spectra of MAN1C^A (amino acids 655–775 of MAN1) and MAN1C^B (amino acids 658–910), corresponding to the first predicted globular domain and the entire carboxyl-terminal nucleoplasmic region of MAN1, respectively. The spectrum of MAN1C^A is well dispersed, confirming that the region from amino acid 655 to 775 adopts a globular structure in solution. Superposition of MAN1C^A and MAN1C^B spectra shows that all peaks of MAN1C^A are found at identical chemical shifts in MAN1C^B spectrum (Fig. 1). This suggests that the three-dimensional structure of MAN1C^A is not affected by the presence of the putative UHM domain. Furthermore, only ~40 additional peaks are found on the MAN1C^B spectrum compared with the MAN1C^A spectrum. These peaks are mostly clustered between 7.5 and 8.5 ppm in the proton dimension. This is not consistent with the presence of a well structured α/β UHM domain. A slow proteolysis of MAN1C^B is observed at 300 K, and analysis of the resulting peptides by SDS-PAGE and amino-terminal sequencing revealed that only MAN1C^A is resistant to proteolysis.

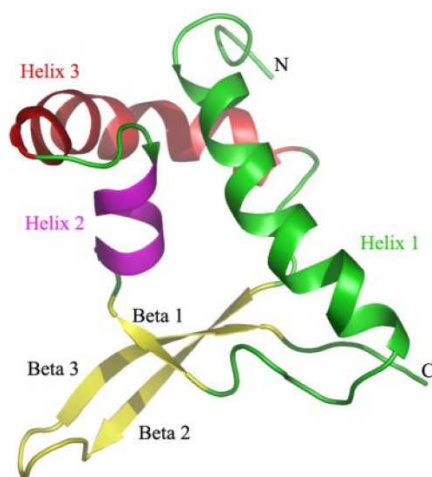


FIGURE 2. Three-dimensional structure of the MAN1 region (666–750). Schematic representation of residues 666–750. The secondary structures are colored in green for α -helix H1, magenta for α -helix H2, red for α -helix H3, and yellow for the three β -strands.

Finally, expression in *E. coli* of the second putative domain alone (amino acid 776–910) yielded a rapidly aggregating protein. All these data suggest that only the first globular domain adopts a stable three-dimensional structure on the NMR time scale (millisecond).

The Fragment from Amino Acid 666 to Amino Acid 750 of MAN1 Adopts a Well Defined α/β Structure—The three-dimensional structure of MAN1C^A was characterized using heteronuclear NMR. In the following, residues belonging to this fragment are numbered from 6 to 126 (residues 1–5 and 127–133 are additional amino acids linked to the plasmid construction). Backbone and side-chain ^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignments were performed from residue 6 to 112 (22). Next, molecular modeling calculations were carried out to obtain a structure consistent with the 1811 NOESY-derived proton-proton distances and the 169 dihedral angle values deduced from TALOS (Table 1). The region between residues 17 and 101 (amino acids 666–750, using the MAN1 numbering) adopts a well defined α/β fold. The backbone r.m.s.d. calculated on this fragment with respect to the mean coordinate yields 1.0 Å. The three-dimensional structure of the region between residues 17 and 101 is constituted of three α -helices, H1 (residues 17–37), H2 (residues 47–54), and H3 (residues 58–76), and three β -strands, S1 (residues 44–46), S2 (residues 81–88), and S3 (residues 92–99), organized into a H1-S1-H2-H3-S2-S3 topology (Fig. 2). Thus, the amino-terminal half of the domain is mainly α -helical, whereas the carboxyl-terminal half is composed of two large β -strands arranged in a twisted anti-parallel β -sheet.

The helices form a three-helix bundle. They are amphipathic, and their hydrophobic core is constituted by Met-20, Val-21, Ile-24, Ile-25, Val-27, and Leu-28 (H1), Val-50, Leu-54 (H2), and Trp-67, Ala-70, Val-71, Leu-74 (H3). The three-stranded β -sheet is packed onto the three-helix bundle. The α/β interface is mainly hydrophobic. It is constituted by Leu-28 (H1), Ile-47 and Val-50 (H2), Trp-67 and Val-71 (H3), which contact the hydrophobic face of the three-stranded β -sheet composed of Met-45 (S1), Val-81 (S2), and Trp-96, Trp-98 (S3). This interface also involves a hydrogen bond network between the backbone of Leu-28 (H1), the side chain of Asn-32 (H1), the side chain of Trp-98 (S3), and the backbone of Arg-80 (S2).

The α/β Structure of MAN1 Corresponds to a Winged Helix Domain—The three-dimensional structure of the fragment between residues 17 and 101 of MAN1C^A was submitted to the DALI server. Its structure is close to the three-dimensional structure of numerous proteins belonging to the winged helix superfamily as defined by SCOP. Winged helix domains are mainly used for DNA recognition (32). The winged helix domain of MAN1 is structurally similar to several DNA binding domains

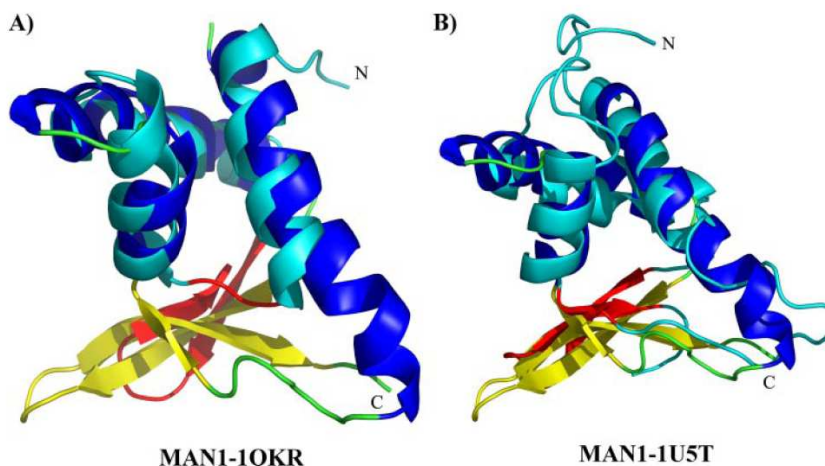


FIGURE 3. Superimposition of the WH domain of MAN1 (α -helices in blue and β -strands in yellow) with those of a domain of the bacterial transcriptional repressor MecI (A) (PDB code 1OKR, α -helices in cyan and β -strands in red) and a module of the ESCRT-II endosomal trafficking complex (B) (PDB code 1U5T, α -helices in cyan and β -strands in red).

MAN1 Carboxyl-terminal Structure

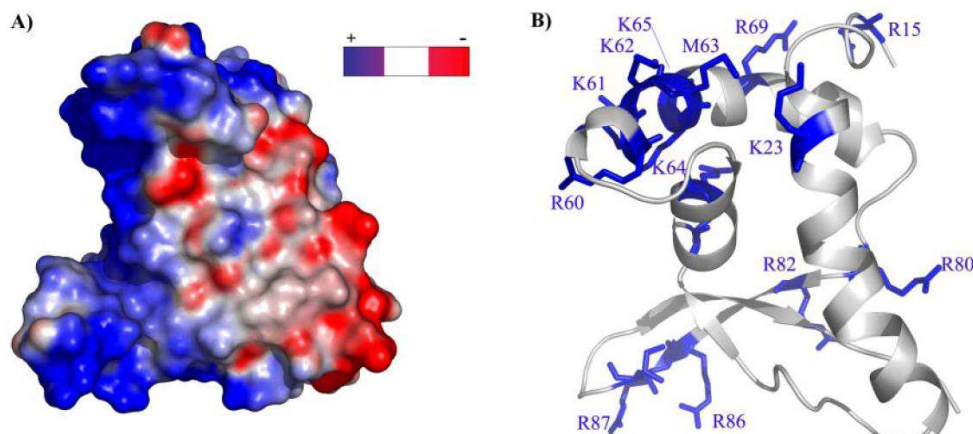


FIGURE 4. Electrostatic properties at the surface of the MAN1 WH domain. *A*, surface representation of the electrostatic potential at the surface of the MAN1 WH domain (from positively charged, in blue, to negatively charged, in red). *B*, schematic representation of the backbone (in gray) and the positively charged side chains (in blue) of the MAN1 WH domain.

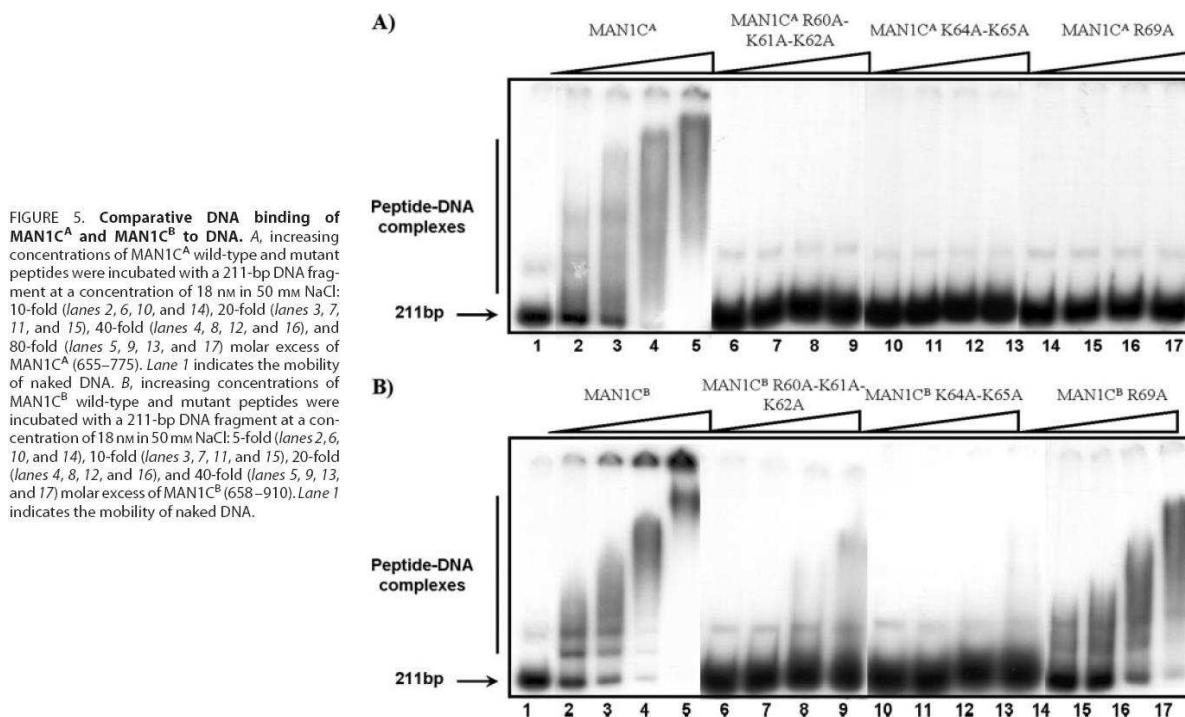


FIGURE 5. Comparative DNA binding of MAN1C^A and MAN1C^B to DNA. *A*, increasing concentrations of MAN1C^A wild-type and mutant peptides were incubated with a 211-bp DNA fragment at a concentration of 18 nM in 50 mM NaCl: 10-fold (lanes 2, 6, 10, and 14), 20-fold (lanes 3, 7, 11, and 15), 40-fold (lanes 4, 8, 12, and 16), and 80-fold (lanes 5, 9, 13, and 17) molar excess of MAN1C^A (655–775). Lane 1 indicates the mobility of naked DNA. *B*, increasing concentrations of MAN1C^B wild-type and mutant peptides were incubated with a 211-bp DNA fragment at a concentration of 18 nM in 50 mM NaCl: 5-fold (lanes 2, 6, 10, and 14), 10-fold (lanes 3, 7, 11, and 15), 20-fold (lanes 4, 8, 12, and 16), and 40-fold (lanes 5, 9, 13, and 17) molar excess of MAN1C^B (658–910). Lane 1 indicates the mobility of naked DNA.

belonging to transcription factors (PDB code 1OKR, Z-score 4.0, sequence identity 5%, Fig. 3*A*; 1P4X, Z-score 3.8, sequence identity 9%) and to histone H5 (1HST, Z-score 3.5, sequence identity 9%). However, recently winged helix domains were also described as protein-RNA (19, 33, 34) and protein-protein (4, 35) interaction modules. The MAN1 winged helix domain is also structurally similar to a protein-protein interaction module belonging to the ESCRT-II endosomal trafficking complex (1U5T; Z-score 4.0, sequence identity 5%, Fig. 3*B*). In this structure, contacts between different winged helices are mediated on one side by the concave surface formed by helices H2, H3, and β -sheet S2-S3 and on the other side by the loop connecting H3 to S2.

Both the Winged Helix Domain and the Entire Carboxyl-terminal Nucleoplasmic Region of MAN1 Interact with DNA—Calculation of the electrostatic potential at the surface of the MAN1 winged helix domain shows that the amino-terminal region of H3 and the tip of the β -sheet are mainly positively charged (Fig. 4). In particular, the sequence RKKMKKVWDR found in H3, which corresponds to the recognition helix in known complexes of winged helix domains with DNA (32), presents 6 positively charged residues (Fig. 4*B*). We tested the importance of these 6 residues for the binding of MAN1C^A and MAN1C^B to DNA by gel shift retardation assay. Therefore, we produced three types of mutants R60A/K61A/K62A, K64A/K65A, and R69A of the recogni-

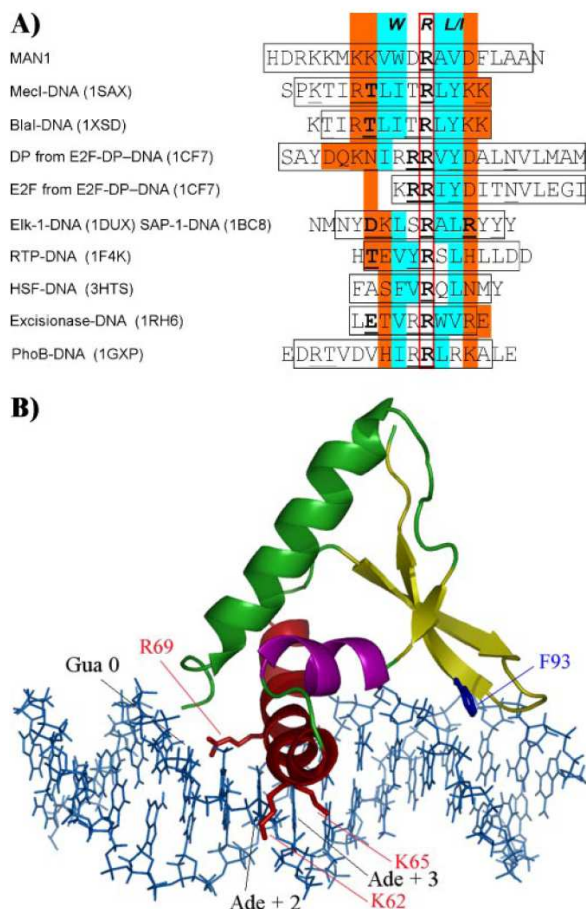


FIGURE 6. Modeling the complex between the WH domain of MAN1 and DNA. A, structural alignment of α -helices H3 of winged helix domains binding to B-DNA (PDB code is indicated in parentheses). Black boxes indicate the limits of H3 sequences. Underlined residues contact DNA through hydrogen bonds; residues in bold interact with bases. The central arginine residue is boxed in a red square; on both sides of this arginine, blue and orange boxes surround hydrophobic and hydrophilic residues, respectively. B, model of the complex between the WH domain of MAN1 and DNA based on analysis of the Mec1-DNA complex (1SAX).

tion helix H3. Interaction with a 211-base pair linear DNA fragment was tested by electrophoresis in a 5% polyacrylamide gel. Fig. 5 shows that the DNA forms complexes with wild-type proteins as demonstrated by delayed migration compared with naked DNA (Fig. 5, A and B, lanes 2-5). The apparent affinities of the two peptides for DNA are 150 ± 13 nM for MAN1C^A and 50 ± 18 nM for MAN1C^B. The appearance of discrete bands with MAN1C^B as well as the higher affinity of MAN1C^B for DNA suggests that the second domain may play a role in the stability of the complex. Consistently, for all mutants of MAN1C^A a complete loss of DNA binding is observed (Fig. 5A, lanes 6-17), whereas the mutant of MAN1C^B, which exhibits a single mutation, R69A, shows only a 10-fold decrease of affinity for DNA (Fig. 5B, lanes 14-17). Yet the two mutants (R60A,K61A,K62A and K64A,K65A) of MAN1C^B present a complete loss of DNA binding (Fig. 5B, lanes 6-13). Thus, several positively charged residues of the recognition helix H3 are involved in the binding of the carboxyl-terminal region of MAN1 to DNA. The poorly structured UHM domain also contributes to the affinity of MAN1 for DNA.

MAN1 Carboxyl-terminal Structure

Modeling of the Complex of MAN1 Winged Helix Domain with DNA—Nine crystal structures of winged helix domains in complex with B-DNA are available. We analyzed these structures to get insight into the structural determinants of the DNA recognition by the winged helix motif. Fig. 6A shows the structural alignment of the recognition helix residues in these complexes. Interestingly, the arginine residue that makes multiple hydrogen bonds with a guanine base is roughly at the center of helix H3. This residue is flanked on both sides by hydrophobic residues. Before and after these two hydrophobic regions, several hydrophilic residues of the H3 helix make contacts with DNA. The MAN1 sequence presents all these characteristics: a central Arg-69, flanked by two hydrophobic regions (Val-66-Trp-67 and Ala-70-Val-71) with hydrophilic residues on both sides. To construct a structural model of the complex between the MAN1 winged helix domain and DNA, we selected the Mec1-DNA complex (36) because of the high DALI score found for Mec1 (PDB code 1OKR). Our domain was globally fitted onto the winged helix structure of Mec1 in complex with DNA using the DALI alignment, and Arg-69 of MAN1 was adjusted to Arg-51 of Mec1. In such a model, the winged helix domain of MAN1 is in close contact with the DNA fragment (Fig. 6B). In particular, the side chain of Arg-69 interacts with the Gua0 (our DNA reference point) by two H-bonds. Moreover, at the beginning of helix H3, Lys-62 and Lys-65 form a salt bridge with the backbone phosphates at Ade+2 and Ade+3, respectively. Therefore, in this complex, 1 residue of each of 3 mutated segments of MAN1 interacts with DNA. Finally, as in other complexes of winged helix domains with DNA, the wing1 (the turn between β 2 and β 3) of the winged helix of MAN1 makes contact with the minor groove: Phe-93 at the tip of the β -sheet is positioned in this groove. Thus, the calculated model is consistent with our experimental data as well as with the published structures of winged helix transcription factors bound to DNA.

DISCUSSION

The Carboxyl-terminal Nucleoplasmic Region of MAN1 Contains a Well Folded Winged Helix Domain but Does Not Show the Predicted Stable UHM Domain—NMR analysis of the solution structure of the carboxyl-terminal nucleoplasmic region of MAN1 showed that this region is composed of a DNA binding winged helix domain followed by a poorly stable/folded peptide fragment. Superimposition of the one-dimensional ¹H NMR spectra of MAN1C^A and MAN1C^B shows that the two spectra are similar (data not shown). The low contribution of the second putative UHM domain to the one-dimensional ¹H NMR spectrum of MAN1C^B indicates that this domain is not completely disordered. Gel filtration experiments carried out on MAN1C^B do not suggest extensive oligomerization or aggregation of this fragment, which could be responsible for the lack of NMR signal. More likely, this lack of signal could be a consequence of a partial unfolding or conformational exchange process. However, the carboxyl-terminal nucleoplasmic region of MAN1 is at least partially functional in the conditions used in this study, as it is capable of binding to the MH2 domain of Smad2 and Smad3 (data not shown). Within the three structurally characterized UHM domains, two of them (from proteins U2AF³⁵ (37) and U2AF⁶⁵ (38)) are in complex with a peptide ligand. Furthermore, the UHM domain of U2AF³⁵ adopts its stable three-dimensional structure upon binding to its ligand (39). The third domain, belonging to the protein TgDRE (40), was characterized alone and was rapidly aggregating.⁶ Similarly, we suggest that the folding and the stability of the UHM domain of MAN1 depend upon binding to a yet unknown biological partner.

⁶ K. Frénel, personal communication.

MAN1 Carboxyl-terminal Structure

The consequence of the unusual behavior of the predicted UHM domain is that most winged helix peaks can be easily identified in the HSQC spectrum of the entire carboxyl-terminal region of MAN1. Essentially no chemical shift perturbations were found between the spectrum of the winged helix domain alone and the spectrum of the winged helix domain within the entire carboxyl-terminal region. This suggests that there is no extensive contact between the winged helix and the predicted UHM domains of MAN1.

The Carboxyl-terminal Nucleoplasmic Region of MAN1 Binds to Both DNA and R-Smads—We carried out gel retardation assays using a 211-base pair linear DNA fragment and increasing quantities of either MAN1C^A or MAN1C^B. Clearly, both domains bind to DNA. The recognition helix H3 of the winged helix domain is critical for this binding, as it is in other published winged helix domain-DNA complexes. The apparent affinity for DNA is only 3-fold higher for MAN1C^B as compared with MAN1C^A, showing that the contribution of the poorly folded MAN1C^B region to DNA binding is not essential.

MAN1C^B also shows a significant affinity for the MH2 domain of R-Smads (8, 9). MAN1C^A, which spans from amino acids 655 to 775 of MAN1 or the predicted UHM domain alone (amino acids 776–910 of MAN1) are not sufficient for R-Smad binding. However, the region from amino acid 730 to amino acid 910 of MAN1, comprising the β 2- and β 3-strands of the winged helix domain, the linker between this domain and the putative UHM domain, and the UHM domain itself, binds to Smad2 and Smad3 (9). Interestingly, it has been shown that several homeodomain and winged helix transcription factors recruit activated Smad2 to distinct promoter elements through an interaction between the MH2 domain of Smad2 and a common Smad binding motif (41). This motif is located after the DNA binding domain of these transcription factors and comprises the following sequence consensus, PPNKT/SI/VX₃hX₄-h, where h is a hydrophobic residue (42). In the case of MAN1, an analogous MH2 binding motif is found within the linker, between Pro-777 and Leu-785, 2 residues after MAN1C^A and a few residues before the first β -strand of the putative UHM domain. This motif PPN^{SLTX}L could participate to the MAN1-Smad2 interaction. Such a hypothesis is consistent with the reported unfolded structure of several free MH2 binding ligands. More generally, as both the two last β -strands of the winged helix domain or the linker region and the putative UHM domain are necessary and sufficient for R-Smad binding and as these regions are essentially distinct from those suggested as critical for DNA binding, *i.e.* the recognition helix and the tip of the β -hairpin (Fig. 6B), we propose that MAN1C^B can bind simultaneously to DNA and the MH2 domain of R-Smads.

CONCLUSIONS

In the nucleus, Smads bind to transcriptional coactivators and promoter regions and play a role in the transcription of numerous genes regulated by transforming growth factor- β superfamily members (43). The MH1 domain of Smads interacts with DNA. However, the affinity of Smads for DNA is relatively low, and Smads require other sequence-specific binding factors to bind efficiently to the promoters of certain responsive genes (44). The MH2 domain of Smads interacts with several such factors, which include a plethora of non-homologous proteins including FoxH1, Mixer, TGIF, CBP, AML1, Ski, and SIP1 (43). MAN1C^A adopts a three-dimensional structural motif found in several of these proteins and binds to DNA with an apparent affinity of 10^{-7} M through its helix H3. This same helix mediates interaction with DNA in classical DNA binding winged helix domains. Furthermore, it was recently proposed that several Smad-associated proteins share a common MH2 binding

motif (41). This motif is partially found in MAN1 25 amino acid residues after the carboxyl terminus of the winged helix domain at the amino terminus of the putative UHM domain. If MAN1 uses this motif to interact with R-Smads, then it can be predicted that the highly homologous human LEM2 protein, which shares the LEM domain, the two transmembrane segments, and the winged helix domain with MAN1 but lacks the linker and putative UHM regions, does not act as an antagonist of the Smad-mediated signaling pathways activated by bone morphogenetic protein, transforming growth factor- β , or activin. Gotzmann and co-workers (30) recently reported that, consistently, they have not been able to detect antagonism of R-Smad-mediated signaling activity by LEM2. As LEM2 exhibits a highly positively charged helix H3 completely similar to MAN1 helix H3 in its winged helix domain, it could potentially regulate MAN1 DNA binding by interacting with the same specific DNA sequences. Finally, MAN1C^B binds to other transcriptional regulators such as GCL and Btf (17). A competition between the different transcription regulators associated to MAN1 might also play a role in the complex regulation of the transcription of genes potentially targeted by the winged helix domain of MAN1.

Acknowledgments—We gratefully acknowledge Roger Genet, Marie Courcon, Mireille Moutiez, and Cedric Masson for their help during protein purification. We thank Philippe Savarin and Flavio Toma, who kindly lent us their 600-MHz spectrometer. The 900-MHz spectra were recorded at the SON NMR Large Scale Facility in Utrecht, which is funded by the Access to Research Infrastructures program of the European Union.

REFERENCES

- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R. D., Shumaker, D. K., and Wilson, K. L. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 21–31
- Worman, H. J., and Courvalin, J. C. (2005) *Int. Rev. Cytol.* **246**, 231–279
- Paulin-Levasseur, M., Blake, D. L., Julien, M., and Rouleau, L. (1996) *Chromosoma* **104**, 367–379
- Lin, F., Blake, D. L., Callebaut, I., Skerjanc, I. S., Holmer, L., McBurney, M. W., Paulin-Levasseur, M., and Worman, H. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 4840–4847
- Rodriguez-Navarro, S., Igual, J. C., and Perez-Ortin, J. E. (2002) *Yeast* **19**, 43–54
- Osada, S., Ohmori, S. Y., and Taira, M. (2003) *Development* **130**, 1783–1794
- Raju, G. P., Dimova, N., Klein, P. S., and Huang, H. C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 428–437
- Pan, D., Estevez-Salmeron, L. D., Stroschein, S. L., Zhu, X., He, J., Zhou, S., and Luo, K. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 15992–16001
- Lin, F., Morrison, J. M., Wu, W., and Worman, H. J. (2005) *Hum. Mol. Genet.* **14**, 437–445
- Hellemans, J., Preobrazhenska, O., Willaert, A., Debeer, P., Verdonk, P. C., Costa, T., Janssens, K., Menten, B., Van Roy, N., Vermeulen, S. J., Savarirayan, R., Van Hul, W., Vanhoenacker, F., Huylebroeck, D., De Paepe, A., Naeyaert, J. M., Vandesompele, J., Speleman, F., Verschueren, K., Coucke, P. J., and Mortier, G. R. (2004) *Nat. Genet.* **36**, 1213–1218
- Hutchison, C. J., and Worman, H. J. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 1062–1067
- Laguri, C., Gilquin, B., Wolff, N., Romi-Lebrun, R., Courchay, K., Callebaut, I., Worman, H. J., and Zinn-Justin, S. (2001) *Structure (Camb.)* **9**, 503–511
- Cai, M., Huang, Y., Ghirlando, R., Wilson, K. L., Craigie, R., and Clore, G. M. (2001) *EMBO J.* **20**, 4399–4407
- Wolff, N., Gilquin, B., Courchay, K., Callebaut, I., Worman, H. J., and Zinn-Justin, S. (2001) *FEBS Lett.* **501**, 171–176
- Shumaker, D. K., Lee, K. K., Tanhehco, Y. C., Craigie, R., and Wilson, K. L. (2001) *EMBO J.* **20**, 1754–1764
- de Oca, R. M., Lee, K. K., and Wilson, K. L. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 42252–42262
- Mansharamani, M., and Wilson, K. L. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 13863–13870
- Wu, W., Lin, F., and Worman, H. J. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, Pt. 7, 1361–1371
- Kielkopf, C. L., Lucke, S., and Green, M. R. (2004) *Genes Dev.* **18**, 1513–1526
- Sambrook, J., Maniatis, T., and Fritsch, E. F. (1989) in *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (Ford, N., Nolan, C., and Ferguson, M., eds) 2nd Ed., pp. 10.60–10.65, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Braud, S., Moutiez, M., Belin, P., Abello, N., Drevet, P., Zinn-Justin, S., Courcon, M., Masson, C., Dassa, J., Charbonnier, J. B., Boulain, J. C., Menez, A., Genet, R., and Gondry, M. (2005) *J. Proteome Res.* **4**, 2137–2147

MAN1 Carboxyl-terminal Structure

22. Caputo, S., Lin, F., Gilquin, B., Worman, H. J., Zinn-Justin, S., and Couprie, J. (2006) *J. Biomol. NMR*, in press
23. Vuister, G. W., Delaglio, F., and Bax, A. (1993) *J. Biomol. NMR* 3, 67–80
24. Kuboniwa, H., Grzesiek, S., Delaglio, F., and Bax, A. (1994) *J. Biomol. NMR* 4, 871–878
25. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) *J. Biomol. NMR* 6, 277–293
26. Savarin, P., Zinn-Justin, S., and Gilquin, B. (2001) *J. Biomol. NMR* 19, 49–62
27. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 54, Pt. 5, 905–921
28. Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999) *J. Biomol. NMR* 13, 289–302
29. Brooks, B. R., Brucoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983) *J. Comp. Chem.* 4, 187–217
30. Brachner, A., Reipert, S., Foisner, R., and Gotzmann, J. (2005) *J. Cell Sci.* 118, Pt. 24, 5797–5810
31. Mans, B. J., Anantharaman, V., Aravind, L., and Koonin, E. V. (2004) *Cell Cycle* 3, 1612–1637
32. Gajiwala, K. S., and Burley, S. K. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 110–116
33. Dong, G., Chakshumathi, G., Wolin, S. L., and Reinisch, K. M. (2004) *EMBO J.* 23, 1000–1007
34. Selmer, M., and Su, X. D. (2002) *EMBO J.* 21, 4145–4153
35. Shin, J. H., Grabowski, B., Kasiviswanathan, R., Bell, S. D., and Kelman, Z. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 38059–38067
36. Garcia-Castellanos, R., Mallorqui-Fernandez, G., Marrero, A., Potempa, J., Coll, M., and Gomis-Ruth, F. X. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 17888–17896
37. Kielkopf, C. L., Rodionova, N. A., Green, M. R., and Burley, S. K. (2001) *Cell* 106, 595–605
38. Selenko, P., Gregorovic, G., Sprangers, R., Stier, G., Rhani, Z., Kramer, A., and Sattler, M. (2003) *Mol. Cell* 11, 965–976
39. Kellenberger, E., Stier, G., and Sattler, M. (2002) *FEBS Lett.* 528, 171–176
40. Frénal, K., Callebaut, I., Wecker, K., Prochnicka-Chalufour, A., Dendouga, N., Zinn-Justin, S., Delepierre, M., Tomavo, S., and Wolff, N. (2006) *Biochemistry* 45, 4867–4874
41. Germain, S., Howell, M., Esslemont, G. M., and Hill, C. S. (2000) *Genes Dev.* 14, 435–451
42. Randall, R. A., Germain, S., Inman, G. J., Bates, P. A., and Hill, C. S. (2002) *EMBO J.* 21, 145–156
43. Massague, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005) *Genes Dev.* 19, 2783–2810
44. Shi, Y., Wang, Y. F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1998) *Cell* 94, 585–594

B. Lettre to the Editor: ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the region 655–775 of human MAN1

Journal of Biomolecular NMR (2006)

© Springer 2006

Letter to the Editor

NMR assignment of region 655–775 of human MAN1

DOI 10.1007/s10858-005-2628-9

MAN1 is a 911 residue vertebrate protein anchored at the inner nuclear membrane. Heterozygous loss-of-function mutations in MAN1 cause syndromes characterized by increased bone density in humans. We here focus on the C-terminal nucleoplasmic region of MAN1, which binds to BAF, to the transcription regulators GCL and Btf, and is responsible for the inhibition of the Smad signalling pathway by interacting with R-Smad proteins (Lin et al., 2005). This region comprises a first domain of unknown fold that we have assigned using heteronuclear NMR on ^{13}C , ^{15}N -labeled MAN1 (655–775), and a second domain (776–911) predicted to be an UHM (RRM-like protein domain). On the basis of the assignment of the first domain, we aim at solving the 3D structure of this domain, and map the interaction site with the second domain, in order to model the 3D structure of the whole C-terminal nucleoplasmic region.

Residues corresponding to region 655–761 of MAN1 were almost all identified: 91% of the backbone chemical shifts and for the side chains, 82% of the aliphatic and 62% of the aromatic ^1H – ^{13}C nuclei were assigned. BMRB deposits with Accession No. 6919.

Reference: Lin et al. (2005) *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 437–445.

Sandrine Caputo^a, Feng Lin^b, Bernard Gilquin^a, Howard J. Worman^b, Sophie Zinn-Justin^a & Joël Couprie^{a,*}

^aDépartement d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, CEA Saclay, 91191, Gif-sur-Yvette, France

^bDepartments of Medicine and of Anatomy and Cell Biology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY 10032, U.S.A.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: jcouprie@cea.fr

Supplementary material is available in electronic format at <http://dx.doi.org/10.1007/s10858-005-2628-9>.

Letter to the Editor: ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the region 655-775 of the human MAN1

Sandrine Caputo^a, Lin Feng^b, Bernard Gilquin^a, Howard J. Worman^b, Sophie Zinn-Justin^{a,*} and Joël Couprie^a,
^aDépartement d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France ; ^bDepartments of Medicine and of Anatomy and Cell Biology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY 10032, U.S.A.

Biological context

MAN1 is a 911 residue vertebrate protein anchored at the inner nuclear membrane. It was first identified using antibodies from a patient with a collagen vascular disease (Lin et al., 2000). Heterozygous loss-of-function mutations in MAN1 cause syndromes characterized by increased bone density in humans (Hellema et al., 2004). MAN1 is part of a protein complex essential for chromatin organization and cell division (Wu et al., 2002; Mansharamani et al., 2005). It also inhibits Smad signalling downstream of transforming growth factor β (Pan et al., 2005; Lin et al., 2005). Sequence analysis indicates that MAN1 spans the inner nuclear membrane twice, resulting in a protein with N- and C-terminal nucleoplasmic domains. At its N-terminus, MAN1 contains a LEM domain that is present in several proteins including the inner nuclear membrane proteins LAP2 and Emerin (Lin et al., 2000). This domain interacts with the DNA-binding Barrier-to-Autointegration Factor (BAF). The whole N-terminal nucleoplasmic region of MAN1 also binds to the nuclear intermediate filaments lamin A and lamin B1 and to Emerin. Thus, it mediates protein-protein interactions through contacts with the chromatin and the nuclear lamina. It is also necessary for the inner nuclear envelope localisation of MAN1 (Wu et al., 2002). We here focus on the C-terminal nucleoplasmic region of MAN1, which binds to BAF, to the transcription regulators GCL and Btf (Mansharamani et al., 2005), and is responsible for the inhibition of the Smad signalling pathway by interacting with several R-Smad proteins (Pan et al., 2005; Lin et al., 2005). This region comprises a first domain (655-775) of unknown fold that we have assigned using heteronuclear NMR, and a second domain (776-911) predicted to be an RRM-like protein interaction domain named UHM. On the basis of the assignment of the first domain, we aim at solving the 3D structure of this domain, and map the interaction site with the second domain, in order to model the 3D structure of the whole C-terminal nucleoplasmic region.

We report here the ^1H , ^{15}N and ^{13}C assignment of the region 655-775 of human MAN1.

Methods and experiments

The region 655-775 of MAN1 was overexpressed in *E. coli* strain BL21 DE3 pLys S transformed with plasmid pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) that encodes glutathione-S-transferase (GST), a thrombin cleavage site and our MAN1 domain. It was purified using Glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) and cleaved using thrombin protease. Because of the cloning strategy, the peptide resulting from the cleavage comprises additional residues from 1 to 5, MAN1 residues from 6 to 126 and again additional residues from 127 to 133. Uniformly labeled ^{15}N protein was produced in minimum medium M9 containing 1 g.l⁻¹ of $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Boehringer) as the nitrogen source. Uniformly labeled $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ protein was produced in a rich medium prepared from uniformly labeled $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ *Spirulina maxima* cyanobacteria. The resulting protein was characterised by electrospray ionization mass spectroscopy and N-terminus sequencing. NMR samples (about 0.8mM) were prepared in Phosphate 50mM buffer pH 6.0 containing 150mM NaCl in either 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O or in 100% D_2O , 1mM EDTA, a protease inhibitor cocktail (SIGMA), 1 mM TCEP, and 1mM NaN_3 . 3-(trimethylsilyl)[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$] propionate (TSP) was added as a chemical shift reference. ^{13}C and ^{15}N chemical shifts were referenced indirectly to TSP, using the absolute frequency ratios. All experiments were performed at 30°C on Bruker DRX-600 or DRX-900 spectrometers equipped with triple-resonance probes. Sequential backbone resonance assignments were achieved using the following experiments: ^{15}N - ^1H HSQC, HNCO, HNCA, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, HNCACB, CBCACOHA, HNHA, (HCA)CO(CAN)NH. $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$ nOe measurements were carried out in order to characterise the backbone dynamics. Side chain assignments were obtained using HBHA(CO)NH, HCCH-TOCSY, HCCH-COSY and ^{13}C -HSQC NOESY experiments. All spectra were processed with the programs Xwinnmr (Bruker) or NMRPipe (Delaglio et al., 1995) and analysed with Felix (Molecular Simulations).

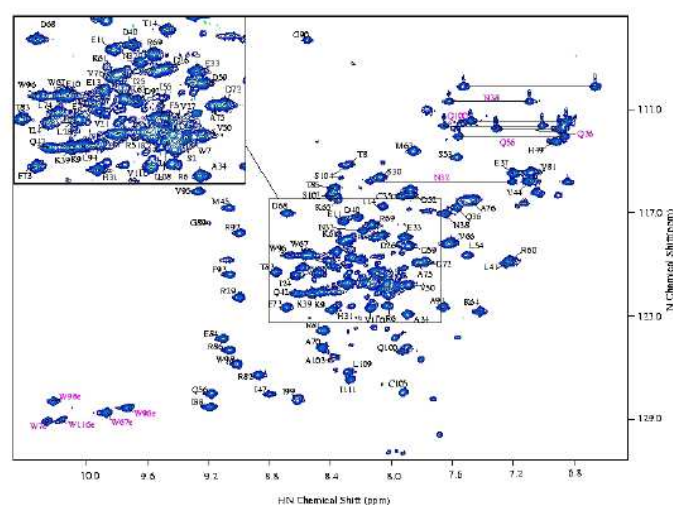


Figure 1. ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the region 655-775 of human MAN1.

Extend of assignments and data deposition

Figure 1 shows the ^{15}N - ^1H HSQC spectrum of the 133 residue peptide containing the region 655-775 of MAN1. 132 backbone cross-peaks are observed while only 125 (133 minus 8 prolines) were expected from the amino acid sequence. Backbone and side chain assignments and 3D ^{15}N HSQC-NOESY patterns revealed that 3 spin systems are splitted in two (S102, A103, S104). 31 backbone ^{15}N - ^1H cross-peaks were not assigned. $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$ nOe measurements show that these cross-peaks mainly correspond to unfolded residues. Most of them are located in the C-terminal region.

Finally, residues 6 to 112 corresponding to region 655-761 of MAN1 were almost all identified: in the backbone, 88% of NH and ^{15}N , 90% of ^{13}C , 91% of ^1H and 94% of ^{13}CO chemical shifts were assigned; in the side chains, 82 % of the aliphatic and 62% of the aromatic ^1H - ^{13}C nuclei were assigned. Determination of the peptide topology showed that the non assigned backbone nuclei correspond to 3 residues in the N-terminal helix and 3 residues in a loop. Non assigned side-chain nuclei belonging to backbone assigned residues mainly correspond to 11 long side chains.

The ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shifts of the region 655-761 of human MAN1 have been deposited in the BioMagResBank (<http://bmrb.wisc.edu>) under accession number 6919.

Acknowledgements

S.C., J.C. and S.Z. are supported by grants from 'Associaton Française contre les Myopathies' (AFM, grants No. 8699 and 9513)

We are grateful to Philippe Savarin and Flavio Toma who kindly lent us their 600 MHz spectrometer.

The 900 MHz spectra were recorded at the SON NMR Large Scale Facility in Utrecht, which is funded by the 'Access to Research Infrastructures' program of the European Union.

References

- Hellemans J., Preobrazhenska O., Willaert A., Debeer P., Verdonk P. C., Costa T., Janssens K., Menten B., Van Roy N., Vermeulen S. J., Savarirayan R., Van Hul W., Vanhoenacker F., Huylebroeck D., De Paepe A., Naeyaert J. M., Vandesompele J., Speleman F., Verschoren K., Coucke P. J., Mortier G. R. (2004) *Nat Genet.*, **36**, 1213-8
- Lin, F., Blakes, D. L., Callebaut, I., Skerjane, I. S., Holmertz, L., McBurney, M. W., Paulin-Levasseur, M. and Worman, H. J. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 4840-4847.
- Lin, F., Morrison J. M., Wu W. Worman H. J. (2005) *Hum Mol Genet.*, **14**, 437-45.
- Mansharamani M., Wilson K. L. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 13863-70.
- Pan D., Estevez-Salmeron L. D., Stroschein S. L., Zhu X., He J., Zhou S. and Luo K. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 15992-6001.
- Wu, W., Lin, F. and Worman, H. J. (2002) *J. Cell Science*, **115**, 1361-1372.

3. Résultats complémentaires non publiés

A. La conservation en séquence de la région C-terminale de MAN1

Nous avons réalisé avec le logiciel MUSCLE (http://phylogenomics.berkeley.edu/cgi-bin/muscle/input_muscle.py) un alignement de toutes les séquences disponibles du domaine WH de MAN1 et de LEM2, qui ne contient pas le domaine UHM (voir figure 12 p 28), ainsi qu'un alignement des séquences du domaine UHM de MAN1 afin d'analyser la conservation de ces séquences au cours de l'évolution (figure 38 et 39). Dans toutes ces séquences, on retrouve le domaine LEM, suivi d'une région N-terminale plus ou moins longue, deux passages transmembranaires, un domaine WH, et un domaine prédit comme UHM uniquement pour les protéines MAN1. Les différentes séquences de MAN1 disponibles vont du moustique à l'homme alors que pour les séquences de LEM2, on peut remonter jusqu'à la levure.

Nous avons aussi réalisé un alignement avec les séquences disponibles du domaine UHM. Nous avons réuni des séquences allant de la drosophile à l'homme. Le domaine UHM est très bien conservé au cours du temps : on peut calculer une identité de séquence moyenne par résidu de 75% et les résidus sont très conservés au cours de l'évolution (60%). Le fragment 655-775 de MAN1 a une identité de séquence moyenne par résidu de 65% mais seulement 17 résidus sur 91 (19%) présentent une grande conservation de la séquence. Les résidus les plus conservés du domaine WH correspondent principalement à des résidus du cœur hydrophobe (7 résidus), trois résidus ont un rôle structural, les derniers sont dans des boucles ou exposés au solvant (figure 39). Parmi ces résidus conservés, trois appartiennent à l'hélice de reconnaissance H3 de notre motif WH mais ils ne sont pas impliqués dans l'interaction avec l'ADN.

MAN1 Homo sapiens	EE	TRQ	MYDMVVKI	IDVLRSHNEACQENKDL	----	QP	YMP	IPHV	RDSLIQ	P	----	HDR	KKM	KKV	WDR	AVD	FLA	ANES	-RVRTET	TRRI	-GGADFLVWR	WIQ	P																																																																									
MAN1 Pan troglodytes					----						----																																																																																					
MAN1 Bos taurus	EE	TRQ	MYDMVVKI	IDVLRSHNEACQENKDL	----	QP	YMP	IPHV	RDSLIQ	P	----	HDR	KKM	KKV	WDR	AVD	FLA	ANES	-RVRTET	TRRI	-GGADFLVWR	WIQ	P																																																																									
MAN1 Canis familiaris	EE	TRQ	MYDMVVKI	IDVLRSHNEACQENKDL	----	QP	YMP	IPHV	QDSLIQ	P	----	HDR	KKM	KKV	WDR	AVD	FLA	ANES	-RVRTET	TRRI	-GGADFLVWR	WIQ	P																																																																									
MAN1 Gallus gallus	EE	TRQ	MYDMVVKI	IDVLRSHSEACSENKDL	----	QP	YMP	ILHV	HDSLI	PA	----	QDR	RRK	M	KV	WSRA	VD	FLA	ANES	-RVRTET	TRRI	-GGA	EFV	WKWMQ	P																																																																							
MAN1 Rattus norvegicus	EE	TRQ	MYDMVVKI	IDVLRSHNEACQETKDL	----	QP	YMP	IPHV	RDSLIQ	P	----	QDR	KKM	KKV	WER	AVD	FLA	ANES	-RVRTET	TRRV	-GGADFV	VWR	WVQ	P																																																																								
MAN1 Mus musculus	EE	TRQ	MYDMVVKI	IDVLRSHNEACQETKDL	----	QP	YMP	IPHV	RDSLIQ	P	----	QDR	KKM	KKV	WDR	AVD	FLA	ANES	-RVRTET	TRRV	-GGADFLVWR	WIQ	P																																																																									
MAN1 Xenopus laevis	EE	TRQ	MYDMVVKI	IDVLKSHNEACQENKGL	----	EP	YTP	IPHV	RDSLI	L	P	----	QDR	KKM	KKV	WDR	AVE	FLD	ANES	-RVRTET	QTKI	-GGADFQ	VWK	WIQ	P																																																																							
SANE Xenopus laevis	EE	TRQ	MYDMVVKI	IDVLKSHNEACQENKGL	----	EP	YTP	IPHV	RDSLI	L	P	----	QDR	KKM	KKV	WDR	AVE	FLD	ANES	-RVRTET	QTKI	-GGADFQ	VWK	WIQ	P																																																																							
MAN1 Danio rerio	EE	TRH	MYDMVERI	IDVLRSHNEACQENKDL	----	QA	YLP	IPHV	RDSLV	Q	P	----	QER	KRM	KKV	WDR	AVS	FLS	ANES	-RIRTEK	QRI	-GGADFM	VWR	WLQ	P																																																																							
MAN1 Apis mellifera	-TERE	VFK	LVSDI	INMVMHQNAAISSPGST	----	QES	FLAIN	HIRD	NLI	P	P	----	KDR	KKM	AGL	WEK	AVK	FLD	ENES	-RIRREV	QOV	-SGEEF	HV	WR	WL	-P																																																																						
MAN1 Strongylocentrotus p	QER	LEV	TQL	VEKII	EVLANHQQAC	YQDKSL	----	TP	YLA	IPHV	RDTL	IP	P	----	ADR	HKK	QHL	WQK	AVQ	FLN	VNES	-RVRVET	QOV	-AGEE	FAV	WR	WVQ	P																																																																				
MAN1 Drosophila m	EALL	AVD	QFQ	KDII	NELIYLSSQSE	----	SP	EV	VIN	QLQ	EKFL	PA	----	KKR	SKL	LSS	WNK	ALK	QLE	KNDS	-RVLF	G	MVNR	-DG	KAM	RTIAW	---																																																																					
MAN1 Drosophila p	KAL	VAVD	QLT	KDII	QELKNQSLQSE	----	SP	EL	TN	QLQ	EKFL	VP	S	----	EKR	SQ	L	SYWN	KAI	KML	EKIDS	-RVLF	G	MALR	-DG	KT	LRTIAWNR	-																																																																				
MAN1 Anopheles gambiae	KRRD	QV	NRL	ISEI	IHAVSQAAANASDAAANKD	TTDGGVQQAGGVINHLRDLIGM	----						----	TN	RRK	L	AWAN	EAL	D	FL	Q	HES	-RIA	F	E	VASI	-AGEDFRV	MRWIDT																																																																				
LEM2 Homo sapiens	EEE	Q	AM	YEMVKKI	IDVVQDHYVDWEQDMER	----	YP	YV	GIL	HVR	DSL	IP	P	----	Q	SR	R	M	KRV	WDR	AVE	FLAS	NES	-RIQ	T	ES	HRV	-AGEDMLV	WRWTKP																																																																			
LEM2 Pan troglodytes	EEE	Q	AM	YEMVKKI	IDVVQDHYVDWEQDMER	----	YP	YV	GIL	HVR	DSL	IP	P	----	Q	SR	R	M	KRV	WDR	AVE	FLAS	NES	-RIQ	T	ES	HRV	-AGEDMLV	WRWTKP																																																																			
LEM2 Bos taurus	EEE	Q	AM	YEMVKKI	IDVVQDHYVDWEQDMER	----	YP	YV	GIL	HVR	DSL	IP	P	----	Q	SR	R	M	KRV	WDR	AVE	FLAS	NES	-RIQ	T	ES	HRV	-AGEDMLV	WRWTKP																																																																			
LEM2 Canis familiaris	EEE	Q	AM	YEMVKKI	IDVVQDHYVDWEQDMER	----	YP	YV	GIL	HVR	DSL	IP	P	----	Q	SR	R	M	KRV	WDR	AVE	FLAS	NES	-RIQ	T	ES	HRV	-AGEDMLV	WRWTKP																																																																			
LEM2 Gallus gallus	EEE	Q	AM	YDMVKKI	IAVVQDHYKEWERNLER	----	YP	YV	GIL	HVR	DSL	IP	P	----	Q	SR	K	M	KRV	WNR	AVE	FLAS	NES	-RIQ	T	ES	HRV	-AGEDMLV	WRWTKP																																																																			
LEM2 Rattus norvegicus	EEE	Q	AM	YEMVKKI	IDVVQDHYVDWEQDMER	----	YP	YV	GIL	HVR	DSL	IP	P	----	Q	SR	R	M	KRV	WDR	AVE	FLAS	NES	-RIQ	T	ES	HRV	-AGEDMLV	WRWTKP																																																																			
LEM2 Mus musculus	EEE	Q	AM	YEMVKKI	IDVVQDHYVDWEQDMER	----	YP	YV	GIL	HVR	DSL	IP	P	----	Q	SR	R	M	KRV	WDR	AVE	FLAS	NES	-RIQ	T	ES	HRV	-AGEDMLV	WRWTKP																																																																			
LEM2 Apis mellifera	----	EV	F	K	L	V	S	D	I	N	M	V	M	H	Q	N	A	A	I	S	S	P	G	S	T	----	QES	FLAIN	HIRD	NLI	P	P	----	KDR	KKM	AGL	WEK	AVK	FLD	ENES	-RIRREV	QOV	-SGEEF	HV	WR	WL	-P																																																	
SRC1 yeast	RKK	ARIE	EEL	V	TQ	T	ME	K	L	K	F	Q	K	I	K	S	M	S	D	P	K	E	----	NA	Y	L	S	I	V	Q	L	R	D	I	F	L	S	D	----	I	V	D	L	K	Y	K	N	L	Q	E	V	V	K	Y	L	E	H	N	N	S	-N	I	K	S	N	L	T	E	I	-R	G	E	I	M	K	C	W	E	I	G																
LEM2 Saccharomyces c	QGE	Q	I	E	K	L	V	K	E	A	D	K	L	D	V	K	K	N	K	G	E	----	EP	FL	T	T	V	Q	L	R	A	T	L	I	L	S	D	----	I	P	N	I	K	E	Q	N	N	L	W	A	Q	T	K	E	K	I	M	K	E	Q	S	E	N	I	E	L	Y	L	L	E	-N	G	E	I	M	T	C	W	E	I	G															
LEM2 Schizosaccharomyces p	VV	K	H	G	V	S	V	C	V	S	H	C	I	A	K	L	Q	K	T	K	L	S	L	T	D	F	S	V	----	NP	R	V	E	V	V	Q	L	R	S	D	C	F	V	S	G	V	A	D	D	K	L	F	E	I	V	L	H	L	P	L	S	I	Q	L	E	I	W	E	K	V	S	V	L	E	G	M	S	V	K	V	D	S	E	R	L	A	----	KN	R	A	E	W	I	G	V	
LEM2 Schizosaccharomyces p	I	V	A	K	Y	L	P	S	A	S	R	F	C	V	E	S	L	K	R	Q	K	A	N	Y	Q	M	S	R	S	Q	----	EP	V	I	P	L	I	E	M	H	D	I	L	F	H	G	----	NG	P	L	E	Q	I	H	M	T	K	A	T	A	R	T	L	W	E	A	I	V	E	R	V	E	Q	V	G	S	--V	R	T	R	E	S	E	V	-D	G	E	W	T	R	V	W	E	W	G	T
LEM2 Giardia lamblia	I	A	R	I	K	T	Y	L	H	D	Y	K	V	D	M	L	Q	V	A	K	P	G	D	A	K	L	P	G	----	FA	A	V	T	L	V	Q	L	R	D	L	F	L	A	S	----	Y	P	R	V	I	R	L	I	L	W	K	K	V	L	K	N	I	H	S	D	S	--R	I	T	I	T	S	S	I	D	L	T	G	R	I	A	E	F	A	V	W	N	G	L							
LEM2 Dictyostelium d	E	E	L	L	A	I	E	H	N	C	K	S	L	K	I	L	Q	Q	R	T	Q	F	E	----	DP	W	I	S	E	L	I	L	K	D	E	V	M	G	S	----	NN	D	K	K	S	N	L	I	E	K	T	L	E	K	I	S	S	--N	V	R	V	L	C	T	V	K	L	I	-H	G	S	Q	K	T	L	E	W	T	D	S																
LEM2 Caenorhabditis b	L	E	E	T	K	L	Y	E	L	I	D	R	I	T	E	L	I	K	E	S	S	A	D	G	----	DP	Y	V	S	Q	P	H	V	R	D	V	M	F	P	P	----	SK	R	S	A	E	M	N	R	W	E	Q	A	V	K	F	I	D	T	N	E	S	-R	V	A	T	D	V	I	V	L	P	S	G	N	E	C	A	V	W	K	W	I	G	N											
LEM2 Caenorhabditis e	-E	E	A	K	L	Y	E	L	I	E	R	I	T	E	L	I	R	E	S	S	I	D	G	----	DP	Y	V	S	Q	P	H	V	R	D	V	L	F	P	P	----	AK	R	S	A	E	L	A	R	W	E	Q	A	V	K	F	I	D	T	N	E	S	-R	V	A	T	D	V	L	V	L	P	S	G	N	E	C	A	V	W	K	W	I	G													
LEM2 Arabidopsis thaliana	C	F	S	R	R	V	E	E	L	Y	D	Q	V	C	D	F	L	E	E	N	A	V	A	S	N	A	E	T	S	N	----	CE	P	W	V	I	A	S	W	L	R	D	Y	L	L	P	----	R	E	R	D	P	L	L	W	T	K	V	E	E	L	I	K	E	-D	S	-R	I	D	R	Y	E	K	L	L	-K	G	E	K	K	V	W	E	W	Q	V	E									
LEM2 Encephalitozoon c	E	E	R	L	H	M	A	R	K	I	M	K	D	I	A	D	V	L	V	R	Q	I	Y	V	S	T	R	N	A	S	----	F	P	S	Y	V	I	E	Q	L	K	D	C	F	G	V	----	D	K	R	V	W	R	E	V	E	S	M	I	L	A	N	-S	-N	I	R	E	S	C	V	E	G	----	R	R	A	E	W	V	G	P															
LEM2 Cryptococcus n	Q	E	K	Y	R	A	E	E	L	V	Q	A	L	K	R	L	D	Q	E	Q	L	H	Y	T	D	P	V	T	N	----	P	Q	P	-F	I	P	R	D	Q	L	R	D	L	V	M	P	H	----	T	G	S	T	A	S	R	L	R	L	W	A	R	V	L	D	M	V	E	R	N	A	--N	V	A	V	R	D	Q	E	L	-K	G	E	I	W	K	T	W	E	A	G	V					
LEM2 Ustilago maydis	R	E	N	V	K	V	S	L	L	V	Q	T	A	L	E	K	L	Q	E	Q	E	Y	L	H	G	R	D	P	V	L	H	----	P	D	D	-F	I	P	L	S	H	L	R	D	D	I	L	R	E	----	E	H	H	S	A	A	R	S	R	L	W	K	K	V	A	K	V	V	E	E	N	-S	-N	V	R	T	R	Q	A	Q	-K	G	E	W	L	R	V	W	Q	I	G	M				
LEM2 Aspergillus oryzae	S	D	M	A	R	V	P	E	L	V	A	T	T	L	D	R	L	A	Q	A	A	L	H	A	R	G	E	A	R	----	EP	Y	I	P	I	G	Q	L	R	D	D	V	L	R	S	----	EL	R	G	S	R	R	E	L	W	R	R	V	R	S	V	V	E	G	N	-A	-N	I	R	A	A	V	R	E	G	R	G	D	V	A	R	V	W	E	W	I	G	G								
LEM2 Aspergillus nidulans	S	D	L	A	R	V	P	E	L	V	A	T	T	L	D	R	L	A	Q	A	A	L	H	A	R	G	H	A	H	----	EP	Y	I	S	I	G	Q	L	R	D	D	V	L	R	S	----	EL	R	G	N	R	R	E	I	W	K	R	V	N	V	V	E	G	N	-A	-N	I	R	A	A	V	R	E	G	R	G	D	V	A	R	V	W	E	W	V	G	G									
LEM2 Neurospora crassa	A	V	A	R	Q	I	P	G	L	V	D	Q	V	L	D	R	L	A	L	Q	K	E	I	A	F	E	S	E	G	D	----	DA	F	L	F	L	P	N	L	R	D	D	V	L	R	S	----	V	H	R	L	A	E	R	E	R	I	W	K	K	V	A	A	V	E	Q	N	S	--N	V	R	T	Q	R	E	S	S	S	G	E	I	A	R	A	W	E	I	G	P							
LEM2 Magnaporthe grisea	A	T	K	A	Q	V	P	R	L	V	D	M	V	L	E	R	L	A	A	Q	K	E	L	A	Y	D	T	G	E	D	----	DP	F	L	F	L	P	N	L	R	D	D	V	L	R	E	----	K	H	S	L	A	E	R	E	R	I	W	Q	R	V	R	T	V	V	E	Q	N	S	--N	V	R	Q	G	R	E	G	R	D	G	E	V	G	R	A	W	E	I	G	P						
LEM2 Gibberella zeae	A	T	K	A	Q	V	P	A	L	V	D	I	V	L	E	R																																																																																

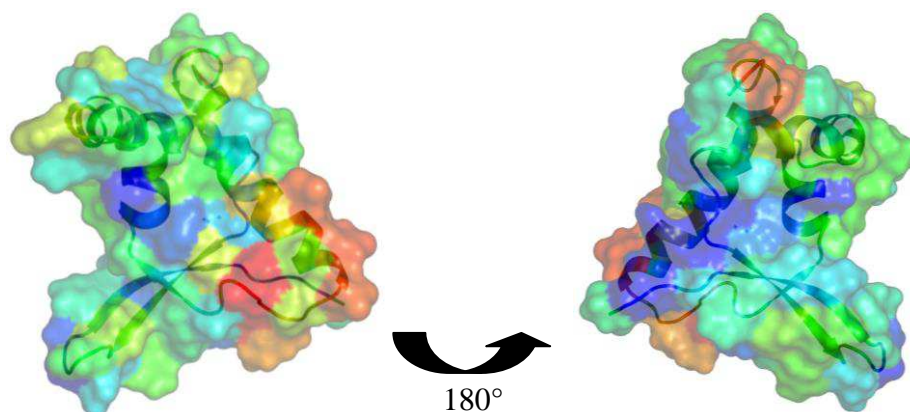


Figure 39 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la région 655-775 de MAN1. Le code couleur indique le degré de conservation du bleu foncé pour les résidus les plus conservés au rouge pour les résidus les moins conservés.

Les résidus conservés, dans des boucles ou exposés au solvant sont au nombre de sept (His49, Arg51, Asp52, Glu78, Ser79, Arg80 et Arg97) et représentent deux surfaces bien distinctes. La surface impliquant Glu78, Ser79, Arg80 a été proposée comme surface d'interaction de la protéine BAF mais cela n'a pas encore été prouvé (Mansharamani and Wilson, 2005). Aujourd'hui, aucune interaction impliquant MAN1 et un de ses partenaires n'a été décrite en faisant intervenir ces différentes surfaces.

B. Modélisation du domaine UHM

Nous avons réalisé un modèle du domaine UHM de MAN1 à partir d'un alignement des séquences des domaines UHM de différentes protéines (Kielkopf et al., 2004). L'analyse de ce modèle confirme que MAN1 ne possède pas les résidus aromatiques des motifs RNP en général impliqués dans la reconnaissance de l'ARN, mais possède des insertions de séquence dans la première hélice et un motif conservé Arg-X-Phe (où X est un acide aminé) dans la boucle entre la deuxième hélice et le dernier brin du repliement (figure 40). Ce dernier motif est essentiel pour la liaison du domaine UHM de U2AF³⁵ à son partenaire protéique U2AF⁶⁵, par exemple.

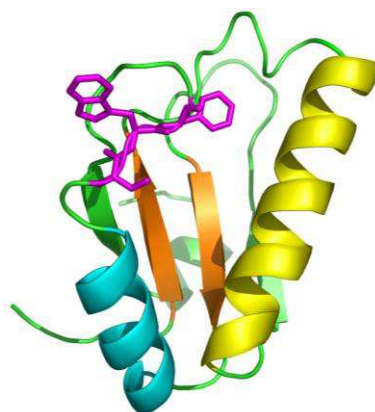


Figure 40 : Modèle du domaine UHM de MAN1 réalisé à partir d'un alignement de la littérature (Kielkopf et al., 2004). Sur cette représentation, la première hélice est représentée en jaune, la deuxième en cyan, les RNP-like en orange et le motif conservé en rose.

C. Essais de cristallogénèse

En parallèle de l'étude RMN, des essais de cristallogénèse ont été réalisés sur MAN1C^B. La première étape consiste à déterminer la concentration appropriée des échantillons pour la cristallisation. Un crible matriciel permet d'étudier la solubilité de la protéine en fonction de 9 agents précipitants, à des pH différents (Stura et al., 1994). Les agents précipitants utilisés sont 3 sels (sulfate d'ammonium, phosphate et citrate), et 6 PEG de poids moléculaire allant de 600Da à 10000Da. Dans chaque condition (12 au total), 4 concentrations d'agents précipitants sont testées pour identifier les agents précipitants ayant un réel effet sur la solubilité de MAN1, c'est-à-dire ceux qui permettent de passer de l'état soluble à un précipité en variant faiblement la concentration en agent précipitant. Dans ce cas, des gouttes assises de 1µl de protéines sont mélangées avec 1µl d'agent précipitant.

Enfin, des essais de cristallogénèse ont été réalisés au robot d'Orsay avec 3 cribles différents (Classics, MbClass, MbClassII, Nextal) de 96 puits chacun sur deux concentrations en protéine : 8mg/ml et 16 mg/ml. Dans ce cas, les gouttes assises contiennent 0,1µl de protéine et 0,1µl d'agent précipitant. Le nombre important de conditions de cristallisation permet de mettre en évidence les conditions les plus favorables pour la cristallisation de MAN1C^B. Quelques pistes sont en cours d'exploitation mais pour l'instant, nous n'avons pas observé la présence de cristaux de protéines.

D. Modélisation du complexe MAN1/R-Smads

MAN1 a été décrite comme interagissant avec les protéines R-Smads. Dans l'article sur la caractérisation de la région C-terminale de MAN1, nous avons émis l'hypothèse que l'interaction entre MAN1 et Smads pouvait se faire par l'intermédiaire d'un motif P-P-N-S-L-T-X₂-L présent dans le linker de la région C-terminale de MAN1, deux résidus après MAN1C^A et quelques résidus avant le premier brin du domaine UHM (Caputo et al., 2006a).

Ce modèle n'implique par l'hélice de reconnaissance H3 et est donc compatible avec un complexe ternaire entre MAN1/R-Smads/ADN.

Une autre hypothèse a aussi été envisagée au laboratoire. Sur la base de l'interaction entre le domaine MH2 des protéines R-Smads et un peptide de la protéine SARA (Smad anchor for receptor activation), nous avons réalisé un modèle du complexe MAN1C^B-MH2. SARA est une protéine ancrée à la membrane cytoplasmique, qui interagit avec certaines protéines R-Smads à travers leur domaine MH2 et cette interaction est régulée/dissociée par la phosphorylation des R-Smads (Tsukazaki et al., 1998). Des expériences de co-immunoprécipitation avec le domaine MH2 des R-Smads et différents mutants de SARA ont permis d'identifier un peptide de 85 résidus (SBD : Smad Binding Domain) nécessaire à l'interaction SARA/R-Smads. L'équipe d'Y. Shi a résolu par cristallographie la structure tridimensionnelle du complexe entre le domaine MH2 de Smad2 et un peptide de 57 résidus de SARA suffisant pour l'interaction (Wu et al., 2000). Ce peptide adopte une conformation flexible qui est stabilisée par la liaison à Smad2.

Nous avons donc aligné le linker de la région C-terminale de MAN1, contenant 31 résidus, avec une partie de ce peptide de SARA. Ensuite, nous avons réalisé un modèle de la région C-terminale de MAN1 avec le domaine MH2 de Smad2 (figure 41).

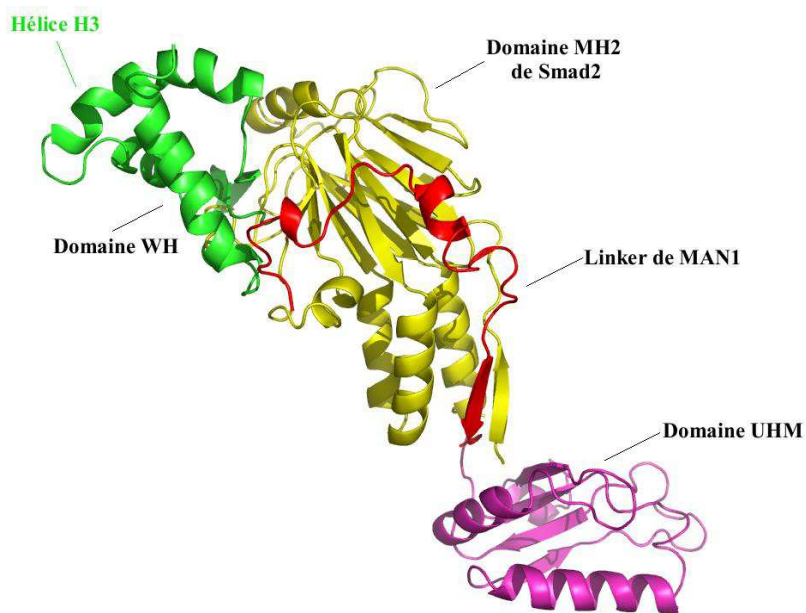


Figure 41 : Modèle du complexe entre la région C-terminale de MAN1 et le domaine MH2 de Smad2. Sur cette représentation, le domaine WH est représenté en vert, le domaine UHM en rose, le linker de la région C-terminale de MAN1 entre le domaine WH et le domaine UHM en rouge et le domaine MH2 de Smad2 en jaune.

Dans ce modèle aussi, on voit que l'hélice de reconnaissance de l'ADN du WH est accessible à l'ADN. En conséquence, l'hypothèse de la formation d'un complexe ternaire MAN1/ADN/ R-Smads reste possible dans ce cas.

E. Essais de production et de purification du domaine MH2 de Smad3

Afin d'identifier les résidus de MAN1 directement impliqués dans l'interaction avec les protéines R-Smads, nous avons décidé d'utiliser la RMN. Cette technique permet d'obtenir rapidement la région de liaison par le suivi des modifications de l'environnement chimique de chacun des résidus de la protéine marquée à l'azote 15 lors du titrage avec le partenaire non marqué. Cependant, elle nécessite l'utilisation de milligrammes de protéines. Il a donc fallu mettre au point les conditions de production et de purification du domaine MH2 d'une des protéines R-Smads humaines. Dans notre cas, il s'agit du domaine MH2 de Smad3 (MH2Smad3) dont le plasmide nous a été fourni par H.J. Worman.

Après surexpression de la protéine GST-MH2Smad3, nous avons réalisé une purification sur colonne d'affinité GS4B (Glutathion Sepharose 4B, Amersham) en condition standard puis une coupure à la thrombine sur colonne. Nous avons un faible rendement de coupure et la protéine coupée ne s'élueait pas. Dans la littérature, cette protéine était purifiée en condition très saline (1M NaCl) et en présence de détergent (NP-40 ou Triton X-100) (Lin et al., 2005). Nous avons repris ces conditions et réussi à éluer la protéine de fusion GST-MH2-Smad3 dans un tampon contenant 100 mM Glutathion, pH 8. Cette protéine de fusion a été ensuite clivée en solution avec de la thrombine. Afin de séparer la GST de notre protéine, nous avons tenté plusieurs stratégies, notamment celle de rajouter MAN1C^B pure sur la protéine de fusion clivée et de réaliser une filtration sur gel mais dans aucun des cas nous n'arrivions à récupérer le complexe MAN1C^B/MH2-Smad3. Sur la base de l'interaction MAN1C^B-MH2Smad3, une autre stratégie a ensuite été exploitée : ajouter MAN1C^B pure au cours de la purification par affinité de GST-MH2Smad3 et tenter une coupure sur colonne à la thrombine de cette fusion dont le domaine MH2Smad3 interagirait avec MAN1C^B pure. Cette expérience a permis d'obtenir le complexe mais pas dans des proportions équivalentes des deux protéines et avec une perte au cours du temps du domaine MH2Smad3. Pour finir, une dernière possibilité a été testée, réunir les cellules ayant surexprimées chacune de nos protéines de fusion avant la purification. Dans ce cas là nous récupérons bien MAN1C^B pure mais pas MH2Smad3.

La structure tridimensionnelle du domaine MH2 des protéines R-Smad a été résolue par cristallographie (Wu et al., 2001). Donc cette protéine a été produite pure et en grande quantité. Une différence majeure entre la construction utilisée par les cristallographes et la

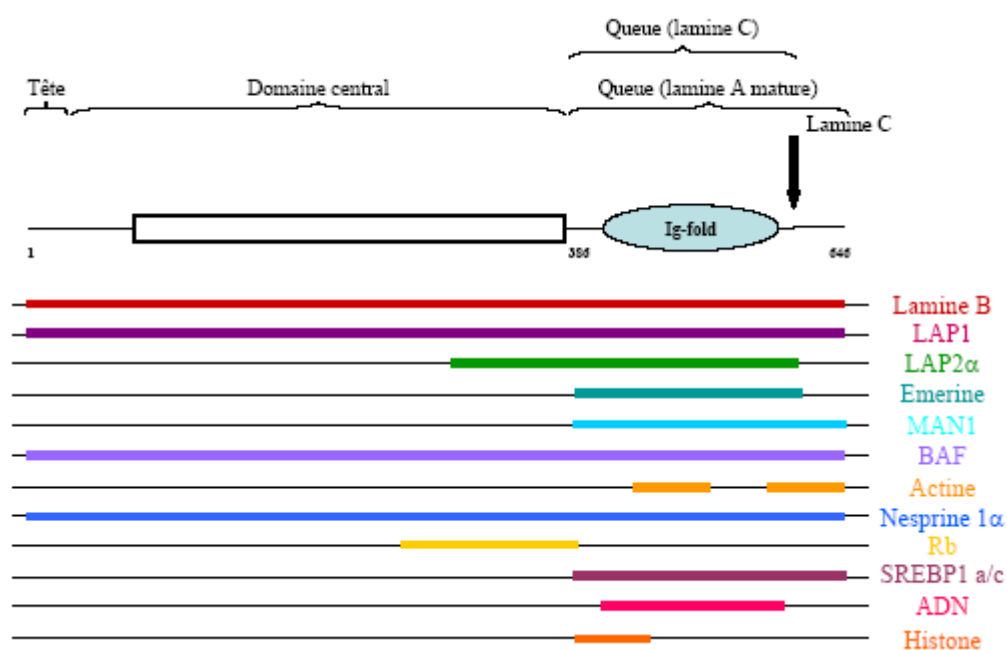
nôtre est la présence de 30 résidus supplémentaires non structurés en N-terminal de la protéine qui doivent aider à la solubilisation et à la structuration de l'ensemble du domaine MH2Smad3. L'équipe de H.J. Worman a donc construit un vecteur d'expression codant pour cette version longue du MH2 fusionnée à la GST pour la purification. Nous sommes actuellement en train de tester la production et la purification de cette nouvelle version du domaine MH2.

Chapitre 3 : Caractérisation des interactions de la lamine A/C et ses partenaires

I. Introduction

Pour aller plus loin dans la caractérisation structurale des interactions de l'enveloppe nucléaire avec les régulateurs de la transcription des gènes, nous avons choisi de travailler sur une protéine essentielle de l'enveloppe, la lamine de type A. Cette protéine filamentaire est au centre d'un vaste réseau d'interactions impliquant en particulier sa région C-terminale dite « queue » (résidus 390 à 464) et différents facteurs de transcription (figure 42A). Notre objectif est de confirmer les interactions décrites dans la littérature et de cartographier les surfaces d'interaction des différents facteurs de transcription sur la région C-terminale de la lamine de type A. Cela afin d'identifier les surfaces fonctionnelles de cette région de la lamine de type A, et de localiser les mutations pathologiques de la lamine de type A par rapport aux sites d'interaction avec ses partenaires. Afin de répondre à ces différentes questions, au cours de ma thèse, j'ai commencé par exprimer et purifier différents fragments de la région C-terminale des lamines de type A (figure 42B), ainsi que de deux de ses partenaires : une protéine de l'enveloppe nucléaire, l'émerine et un facteur de transcription, SREBP1. J'ai ensuite réalisé différentes expériences afin de confirmer les interactions entre les lamines de type A et ces deux partenaires et afin de caractériser les interactions ainsi validées.

A)



B)

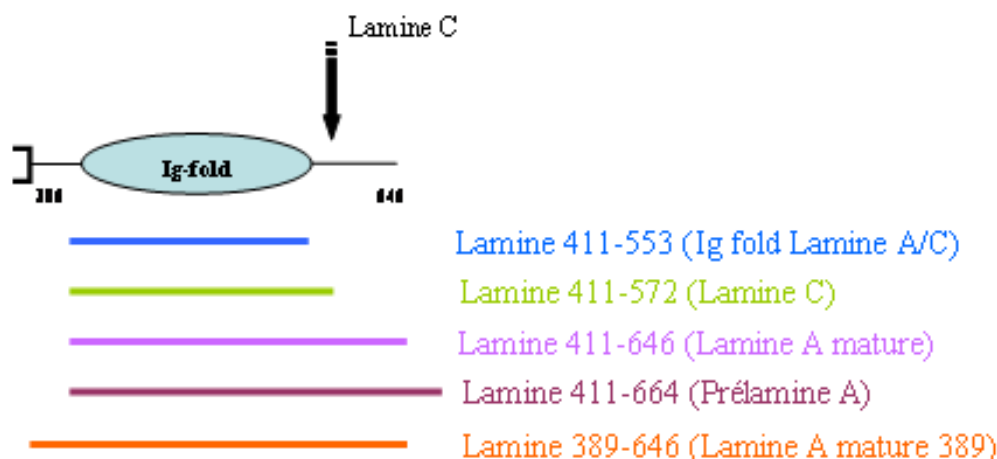


Figure 42 : Schéma représentant la lamine A/C, en A) ses régions d'interactions avec ses différents partenaires (Zastrow et al., 2004) ainsi qu'en B) les fragments de lamine A ou C utilisés dans nos études.

En parallèle, le laboratoire collabore avec différentes équipes de médecins afin d'apporter une analyse structurale des mutants de la lamine de type A trouvés chez les patients. J'ai participé à la caractérisation du mutant R439C des lamines de type A identifié par l'équipe des Pr P.M. Steijlen et F.C.S. Ramaekers à l'hôpital de Maastricht.

II. Interaction de la partie « queue » des lamines A/C avec ses partenaires.

1. Analyse de séquence du domaine de type immunoglobuline

En premier lieu, nous avons réalisé un alignement des séquences du domaine de type immunoglobuline (Ig fold) de toutes les lamines connues avec le logiciel MUSCLE (http://phylogenomics.berkeley.edu/cgi-bin/muscle/input_muscle.py) (figure 43). Cela nous a permis d'observer que ce domaine est très bien conservé au cours de l'évolution dans les lamines de type A et B. Notamment on observe que la surface où sont localisées les mutations responsables de la FPLD est aussi bien conservée chez les lamines de type A que chez les lamines de type B alors que la surface définie par les mutations responsables de la progéria est conservée uniquement chez les lamines de type A (figure 44). Cependant, on ignore quels sont les partenaires des lamines reconnus par ces deux surfaces.

LaminA Homo sapiens SSFSQHARTSGRVAVEEVDEEGKFVRLRNKS-NEDQSMGNWQIKRQN-GD-D-PL--LTYRFPFKFTLKAGQVVTIWAAGAG-ATHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminA Canis familiaris SSFSQHARTSGRVAVEEVDEEGKFVRLRNKS-SEDQSMGNWQIKRQN-GD-D-PL--LTYRFPFKFTLKAGQVVTIWAAGAG-ATHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminA Rattus norvegicus SSFSQHARTSGRVAVEEVDEEGKFVRLRNKS-NEDQSMGNWQIKRQN-GD-D-PL--MTYRFPFKFTLKAGQVVTIWAAGAG-ATHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminA Mus musculus SSFSQHARTSGRVAVEEVDEEGKFVRLRNKS-NEDQSMGNWQIKRQN-GD-D-PL--MTYRFPFKFTLKAGQVVTIWAAGAG-ATHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminA Gallus gallus TSFSHHARTSGRVAVEEVDEEGKFVRLRNKS-NEDQALGNWQIKRQN-GD-D-PP--LTYRFPFKFTLKAGQVVTIWAAGAG-ATHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminA Danio rerio TRIFQASASGRVTVDEVDLEGKFVRLRNKS-DQDQSLGHGWQVLRQI-GS-G-TP--IVYKFPFKFTLKAGQVVTIWAAGAG-GTHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminA Xenopus laevis SSFTQHARTTGKVSVEVDPEGKFVRLRNKS-NEDQSLGNWQIKRQI-GD-E-TP--IVYKFPFKFTLKAGQVVTIWAAGAG-ATNSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminB1 Homo sapiens VSISHSASATGNVCIIEIDVDGKFIRLNKS-EQDQPMGGWEMIRKI-GD-T-S---VSYKYTSRYVLKAGQVVTIWAAGAG-VTASPPTDLIWKQNSWGTGEDVKVLKNSQGEEVAQRSTVFKTTI

LaminB1 Rattus norvegicus VSISHSASATGNVCIIEIDVDGKFIRLNKS-EQDQPMGGWEMIRKI-GD-T-S---VSYKYTSRYVLKAGQVVTIWAAGAG-VTASPPTDLIWKQNSWGTGEDVKVLKNSQGEEVAQRSTVFKTTI

LaminB1 Mus musculus VSISHSASATGNVCIIEIDVDGKFIRLNKS-EQDQPMGGWEMIRKI-GD-T-S---VSYKYTSRYVLKAGQVVTIWAAGAG-VTASPPTDLIWKQNSWGTGEDVKVLKNSQGEEVAQRSTVFKTTI

LaminB1 Gallus gallus VSISHSASATGNVCIIEIDVDGKFIRLNKS-EQDQPMGGWEMIRKI-GD-T-S---VSYKYTSRYVLKAGQVVTIWAAGAG-VTASPPTDLIWKQNSWGTGEDVKVLKNSQGEEVAQRSTVFKTTI

LaminB1 Danio rerio VSIAHSASATGNVSIIEIDVDGKFIRLNKS-EQDQPMAGFQLRTI-GE-V-TA---TYKFTAKYNLKAGQVVTIWAAGAG-ISSNPPADLIWKQNSWGTGENIKVALLSPAGEKAVRSTVFKTAV

LaminB1 Carassius auratus VRIAHSASATGNVCIIEIDVDGKFIRLNKS-EQDQPMAGFQLRTI-GE-V-TA---TYKFTAKYNLKAGQVVTIWAAGAG-ISSNPPADLIWKQNSWGTGENIKVALLSPAGEKAVRSTVFKTAV

LaminB1 Xenopus laevis VSIAHSASATGDSIIEVDMEGKYIRLNKS-EKDQPLGGWELRTI-GE-A-S---VNFKFTSRYVLKAGQVVTIWAAGAG-VTASPPNLIWKQNSWGTGEDVKATLKNNSQGEEVAQRSTVFKTTI

LaminB2 Homo sapiens LPPGPAGLGLGQRHIEEIDLEGKFVQLNNS-DKDQSLGNWRLKRQV-LE-G-EE--IAYKFTPKYILRAGQVVTIWAAGAG-VAHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminB2 Canis familiaris RKRLLEQASASGGVSIIEIDLEGKFVQLNNS-DKDQSLGNWRLKRQV-LE-G-EE--IAYKFTPKYILRAGQVVTIWAAGAG-VAHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminB2 Mus musculus GSRLAQTVATGVNIDEVDPEGKFVRLNKS-DKDQSLGNWRLKRQV-LE-G-ED--IAYKFTPKYILRAGQVVTIWAAGAG-ATHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminB2 Gallus gallus FQMSQQASATGSISIEEIDLEGKFVQLNNS-EKDQSLGNWRLKRQI-GD-G-EE--IAYKFTPKYILRAGQVVTIWAAGAG-VSHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminB2 Danio rerio AQISQQAASAGSVSIEEIDLEGKFVQLNNS-DKDQSLGNWRLKRQI-GD-G-EE--IAYKFTPKYILRAGQVVTIWAAGAG-VSHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminB2 Carassius auratus QVVSQAAEATGSVSVEDIDLEGKFVQLNNS-DKDQSLGNWRLKRQI-GD-E-EE--ITYKFTPKYILRAGQVVTIWAAGAG-VSHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminB2 Xenopus laevis FHLSQASATGSISIEEIDLEGKFVQLNNS-DKDQSLGNWRLKRQI-GE-E-EE--ITYKFTPKYILRAGQVVTIWAAGAG-VAHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminB3 Mus musculus SRLAQQTATGVNIDEVDPEGKFVRLNKS-DKDQSLGNWRLKRQV-LE-G-ED--IAYKFTPKYILRAGQVVTIWAAGAG-ATHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminB3 Gallus gallus FKTVQHASSSGKVSIEEIDADGNFVRLNKS-DEDQPLHGWVLRRLH-ES-V-SD--VAYKFTPKYILRAGQVVTIWAAGAG-VSPG-PSDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminB3 Danio rerio YRLSQHSSCRGPVSIEEIDLDGRIKLNKS-DRDQVVSQWQLRKE-AE-A-PD--IVFCFSPPCVMNAGHMLTVWAAAAG-DQCGSASDLLLSTHQSWSGFADVRVSLNINQNEEMAEYVVDQKTE

LaminB3 Carassius auratus NKLSQHSSSRGNLSIDEIDLGRFIRIKNS-DQDQSVGGWQLRKE-AE-A-PD--VAFQIPSPCVLSSAGQTLTVRAAGSV-MEQVRGDLVLRTHETWGPGEVVRVSLNINQNEEMAEYVVDQKTE

LaminB3 Xenopus laevis YKVVQASSTGPPVSIEDIDPEGKFVRLNKS-EEDFSLHGWVLRRLH-MS-L-PE--IAFKLPCRFILKSSQVVTIWAAGAG-AVHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminB Acipenser baerii YKISQHSSSGPVSVDLEIDLGRFIRIKNS-EEDQPLHGWVLRRLH-LS-V-SD--VYKFTPKYILRAGQVVTIWAAGAG-VSPNPPDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminB Lytechinus variegatus SSITQSATNSGVVAIVESDPEGKFVRLNKS-ETDQALGGWHLKRS-A-DG-G-SE--QSYKFTSKYVLKAGQVVTIWAAGAG-KSQSAPTDLVFKNTESWGTGDNVETTLVDASGEVMATRTVIKEVTT

LaminB Strongylocentrotus purpur SSVTQRPTNNGVVAIVESDPEGKFVRLNKS-DTDQALGGWHLKRSV-DG-G-SQ--QSYKFTSKYVLKAGQVVTIWAAGAG-KSHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

LaminDm0 Drosophila melanogaster ADYYVSASAKGNVEIKEIDPEGKFVRLNKS-SEEVAIGGWQLQRLI-NE-KGPS--TYKFTSKYVLKAGQVVTIWAAGAG-AVHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

Lamin Drosophila miranda SDYYVSASARGNVEIKEIDPEGKFVRLNKS-NEEVAIGGWQLQRLI-NE-KGPS--TYKFTSKYVLKAGQVVTIWAAGAG-AVHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

Lamin Drosophila affinis SDYYVTATAGNVEIKEIDPEGKFVRLNKS-NEEVAIGGWQLQRLI-NE-KGPS--TYKFTSKYVLKAGQVVTIWAAGAG-AVHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

Lamin C. elegans RRSKLNKEITGVPVDEVDLEGKFVRLNKS-EEDQSLGGWQLRKE-AE-A-PD--IVFCFSPPCVMNAGHMLTVWAAAAG-DQCGSASDLLLSTHQSWSGFADVRVSLNINQNEEMAEYVVDQKTE

Lamin Astropecten brasiliensis ETVQSSSTTTGLVAIIESDLKGNFIKLNKS-DQDQALGGWQLRQV-DN-G-DE--ISYKLSAKYILKAGQVVTIWAAGAG-HQPNAPSGLVFKSKTWTGTEKEVSTLVDASGEVMATRTISTTSSS

Lamin Priapulus caudatus YEYSTTDSKGEVRVMECDPDGKFVRLNKS-DKDIHIGTWQLKRIT-GD-K--E--ITYKFTSKYVLKAGQVVTIWAAGAG-AVHSPPTDLVWKAQNTWGCNLSLRTALINSTGEEVAMRKLVRSTV

Lamin Branchiostomalanceolatum AMVTQSATASGFTIDEVDLEGKFVRLNKS-EKDQSLGGWQLRQV-DN-G-DE--ISYKLSAKYILKAGQVVTIWAAGAG-HQPNAPSGLVFKSKTWTGTEKEVSTLVDASGEVMATRTISTTSSS

Lamin Hydra vulgaris EQPHVENNAIGSIEIAECDSDAKFVRLNKS-DKDEPLGGWQLRQV-DG-K-DEQAVEYKFTPKYILKAGQVVTIWAAGAG-VKQKPPPTDFVLKQED-WSHGSSMTTSLINPDAAEIVAKHTIALPTPP

Lamin Tealia sp. STVTTTTTAEATQIVESENPEGKFVRLNKS-DKDEPLGGWQLRQV-GK-E-DP--IVYKFTPKYILKAGQVVTIWAAGAG-GQHKPPAEELLYKHLSSWGSNEVFTALINASGEELAALEEKIFEQ

Figure 43 : Alignement du domaine Ig fold de la région C-terminale des lames de type A et B.

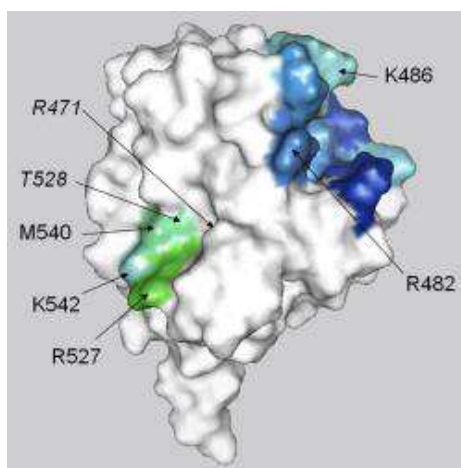


Figure 44 : La représentation de la structure tridimensionnelle du domaine globulaire des lamines révèle une surface chargée positivement hautement conservée dans les lamines de type A et B (Verstraeten et al., 2006). Cette région, colorée en bleu foncé, est affectée dans la FPLD (résidus R482, K486 et G465). Sur la surface des mutations progéroides, les résidus M540 aussi bien que R527 et K542 sont conservés dans les lamines de type A (du poisson à l'homme) mais pas dans les lamines de type B (mutations colorées en vert). Les résidus T528 et R471 (en italique) sont le plus souvent conservés dans tous les types de lamine mais leur chaîne latérale est enfouie et donc ne sont pas vus sur la surface du domaine.

2. Caractérisation structurale en solution de la partie « queue ».

La structure tridimensionnelle du domaine globulaire de la partie « queue » de la lamine de type A, comprenant les résidus 411 à 553, a été résolue au laboratoire par I. Krimm (Krimm et al., 2002). La lamine A mature (411-646) comporte toutefois 93 résidus supplémentaires dans sa partie C-terminale. Nous avons donc entrepris de déterminer si la présence de ces résidus supplémentaires modifiait d'une façon ou d'une autre la structure tridimensionnelle du domaine globulaire. Nous nous sommes intéressés à cette partie déstructurée de la protéine car plusieurs études ont montré qu'elle est impliquée dans des interactions avec différents partenaires comme SREBP1 (Lloyd et al., 2002; Sakaki et al., 2001).

Afin de déterminer l'influence de ces 93 résidus supplémentaires, nous avons comparé les spectres ^1H - ^{15}N HSQC de la lamine A 411-553 et de la lamine A mature 411-646. Cette méthode permet d'observer les modifications des déplacements chimiques des résidus de la lamine 411-553 qui seraient impliqués dans une interaction avec un ou plusieurs des résidus supplémentaires de la lamine A mature (411-646).

La première observation fait apparaître la présence de 72 pics supplémentaires sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de la lamine 411-646 qui correspondent à une grande partie des résidus du fragment 554-646 (figure 45). Ces pics supplémentaires ont des déplacements chimiques caractéristiques d'un peptide déstructuré. De plus, l'addition de 93 résidus en C-terminal du fragment 411-553 de la lamine A induit des changements de déplacements chimiques

significatifs (supérieur à l'écart type de l'ensemble des écarts de déplacements chimiques de tous les résidus : 0,0168 ppm) d'un certain nombre de corrélations Hn-N correspondant au fragment 411-553. Ces variations de déplacements chimiques, définies par $|\Delta\delta| = |\Delta\delta(^1\text{H})| + 0,1 * |\Delta\delta(^{15}\text{N})|$, indiquent un changement dans l'environnement chimique de certains résidus et donc une interaction, dans la lamine 411-646, entre la partie globulaire 411-553 et les 93 résidus supplémentaires.

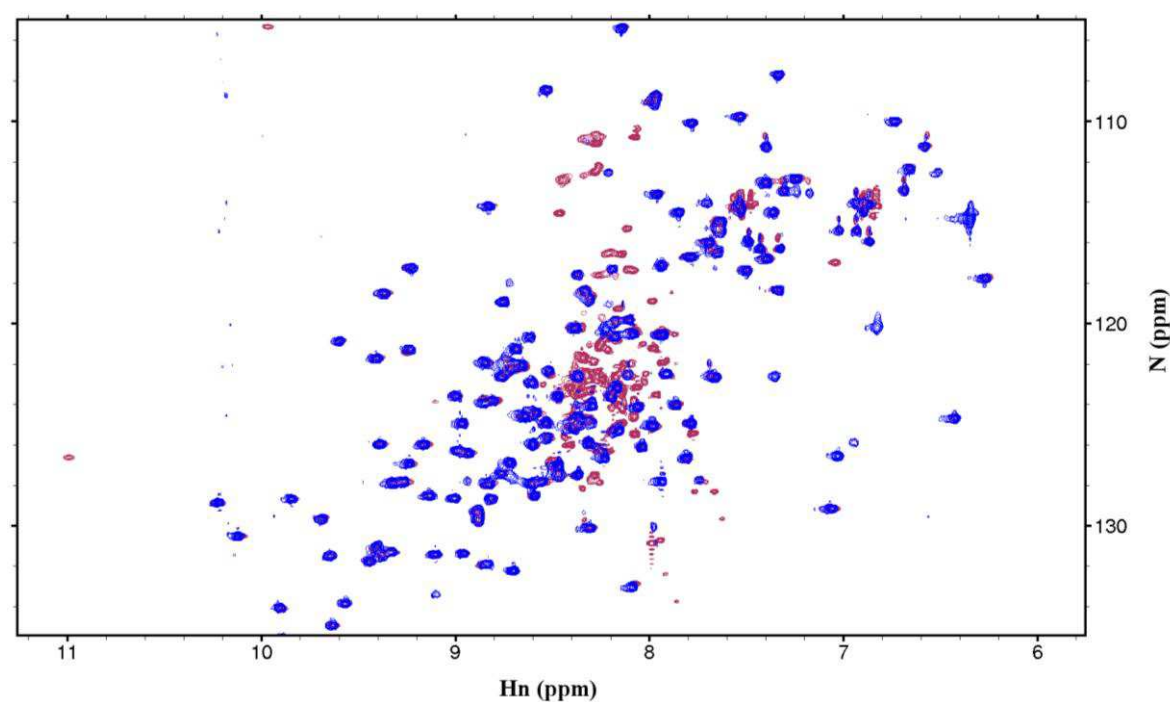


Figure 45 : Impact des 93 résidus C-terminaux de la lamine A mature. Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de la lamine A 411-553 (bleu) et de la lamine 411-646 (pourpre).

L'ensemble des variations de déplacements chimiques induites par la présence des 93 résidus (dont 3 prolines) est représenté sur la figure 46.

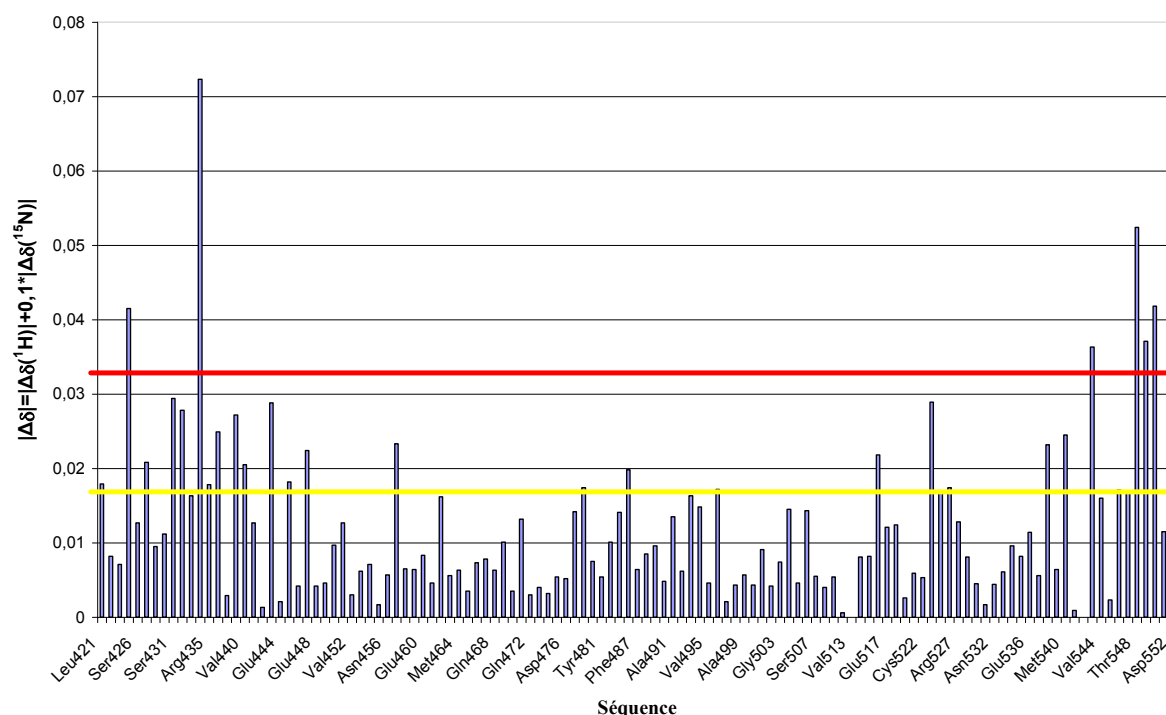


Figure 46 : Ensemble des variations des déplacements chimiques des résidus 411-553 de la lamine 411-646 par rapport aux résidus de la lamine 411-553. Ligne rouge : 2 écart-types, ligne jaune : écart-type.

Les résidus de la structure dont l'écart de déplacement chimique est supérieur à 0,0336 ppm (2 écart-types) ont été colorés en rouge sur la structure de la lamine 411-553 présentée dans la figure 47 : Ser428, Ala434, Leu 543, Thr548, Val549, Val 550 et Asp552. Les résidus dont la variation de déplacement chimique est supérieure à 0.0168 ppm (1 écart-type) ont été colorés en jaune : Leu421, Ser428, Ser431, Gln432, Arg435, Ser437, Arg439, Val440, Glu443, Val445, Glu447, Lys457, Leu479, Lys486, Thr496, Ala516, Gly523, Ser525, Leu526, Val538, Met540, Ser546 et Val547. Cette surface d'interaction concerne principalement les résidus des régions N-terminale et C-terminale de la lamine 411-553 (figure 47). On en conclut que le domaine globulaire garde la même structure tridimensionnelle en présence de la partie C-terminale dépliée et que la partie dépliée interagit peu avec ce domaine.

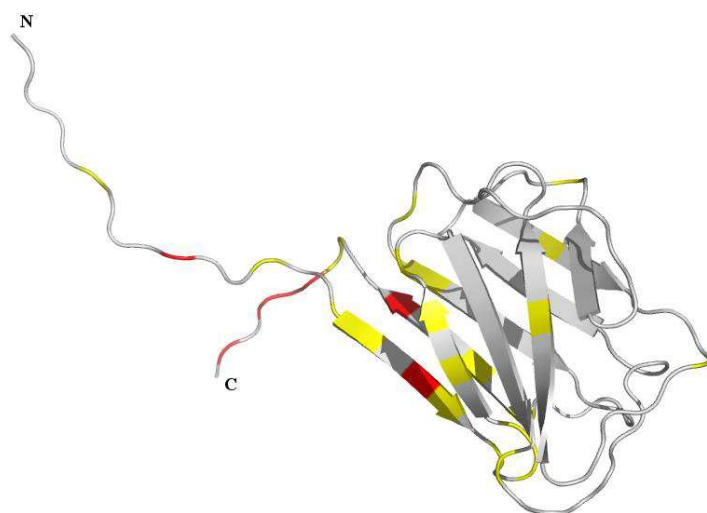


Figure 47 : Surface d'interaction entre le domaine globulaire 411-553 et les résidus 554-646 de la lamine 411-646. Les résidus rouges correspondent aux résidus dont la variation de déplacement chimique est supérieure à 2 écart-types, et les jaunes à ceux dont la variation de déplacement chimique est supérieure à 1 écart-type.

Plusieurs interactions décrites entre la lamine A et ses différents partenaires semblent impliquer cette région 554-646 (Lloyd et al., 2002; Sakaki et al., 2001). Cette région pourrait se structurer au contact de partenaires.

3. Analyse de l'interaction entre la lamine de type A et l'émerine

Afin de confirmer et d'approfondir les études d'interaction de la lamine A/C avec l'émerine, nous avons d'abord entrepris de vérifier l'interaction de nos domaines de lamine A/C avec l'émerine, par une méthode biochimique (pulldown).

Pour cela, nous avons travaillé à obtenir des milligrammes d'émerine sous forme soluble dans *E. coli*, alors que les papiers décrivant l'interaction émerine-lamine sont basés sur l'utilisation d'émerine se trouvant dans des extraits cellulaires ou d'émerine purifiée à partir de corps d'inclusion obtenus chez *E. coli*. Après avoir réalisé des tests d'expression et de purification sur différentes constructions (cf Chapitre 5 : Matériel et méthodes), nous avons sélectionné la construction n°1 réalisée par Cecilia Östlund à Columbia University (NY).

A. Mise au point des conditions d'expression de l'émerine 1-187



Figure 48 : Schéma représentant l'émerine et le fragment utilisé dans nos études

a - Les constructions issues de la plate-forme

Les premiers essais d'expression de l'émerine humaine (1-187) avaient été réalisés pendant mon DEA sur un plasmide fourni par H.J. Worman (figure 48). Cette protéine se surexprimait très peu chez *E. coli* dans des conditions standard d'expression (37°C pendant 3 h). De plus, la protéine surexprimée se trouvait essentiellement dans les corps d'inclusion. Afin d'obtenir de la protéine soluble en quantité suffisante pour réaliser des expériences RMN, plusieurs stratégies ont été utilisées.

Nous avons commencé par modifier le plasmide initial pour changer le site de clivage, le partenaire de fusion et la position de ce dernier, en collaboration avec la plate-forme de production de protéines recombinantes chez *E. coli* du DIEP. Cela a permis d'obtenir une forte surexpression de la protéine mais majoritairement en corps d'inclusion quelque soit le plasmide ou la souche de *E. coli* utilisés (tableau 3).

Souche	Plasmide	Surexpression	Solubilité
BL21 AI	E15	+++	+/-
BL21 AI	E17	+++	+
BL21 AI	E24	+++	-
BL21 AI	E42	-	-
BL21 AI	E49	+++	+/-
BL21 DE3 Rosetta	E17	+++	+/-

Tableau 3 : Résultats des tests de surexpression des différents plasmides de l'émerine issus de la plate-forme. E15 : plasmide codant pour une fusion GST en N-terminal de l'émerine, E17 : plasmide codant pour un tag histidine en N-terminal de l'émerine, E24 : plasmide codant pour une fusion GST en C-terminal de l'émerine, E42 : plasmide codant pour un tag histidine en C-terminal de l'émerine et E49 : plasmide codant pour une fusion thioredoxine en N-terminal de l'émerine.

Nous avons ensuite co-exprimé l'émerine avec des protéines chaperons qui interviennent dans le repliement des protéines. Cette technique a permis d'obtenir de l'émerine soluble et purifiée mais en trop petite quantité pour une étude structurale (figure 49).

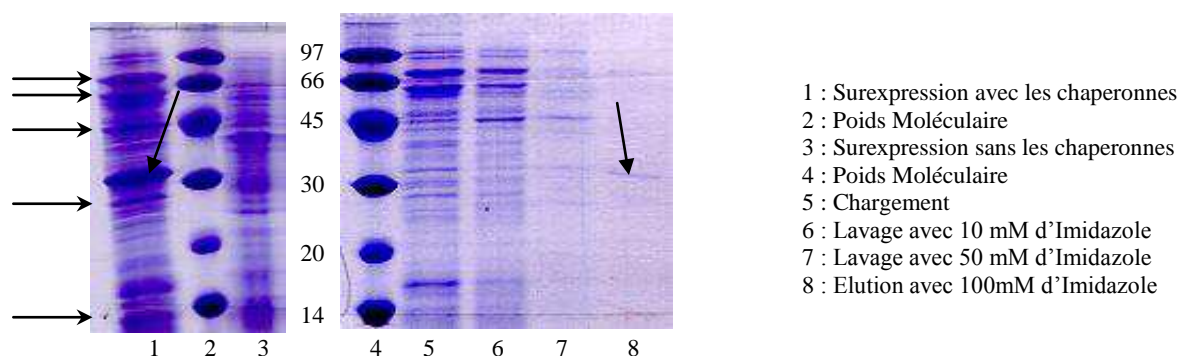


Figure 49 : Gel représentant la co-expression de l'émerine avec les protéines chaperons et la purification de cet essai. Les flèches horizontales indiquent les cinq protéines chaperons, la flèche de la piste 1 indique la surexpression de l'émerine parmi les protéines bactériennes et la flèche de la piste 8 montre l'émerine purifiée.

La majeure partie de la protéine exprimée se localisait toujours dans les corps d'inclusion. Nous avons donc utilisé une technique qui permet d'extraire la protéine de ces corps d'inclusion et de la renaturer. Cependant en fin de renaturation, à la concentration, la protéine précipite (figure 50).

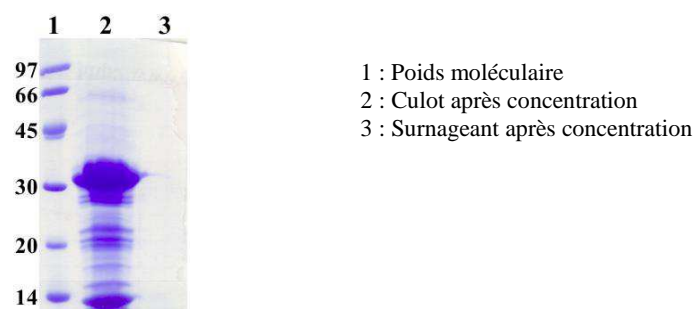


Figure 50 : Gel représentant le culot après la concentration de l'émerine à la fin de l'extraction à partir des corps d'inclusion.

b - La construction TEV#1

Au vu des résultats précédents, une nouvelle stratégie a été adoptée pour exprimer l'émerine de façon soluble. L'émerine interagit avec la lamine qui s'exprime très bien donc des constructions ont été réalisées à partir de cette idée par Cecilia Ostlund à Columbia University (New York) (figure 51). La lamine 411-566 correspond au domaine C-terminal commun entre les lamines A et C, l'émerine 1-187 correspond à presque toute la partie N-terminale nucléoplasmique de l'émerine.

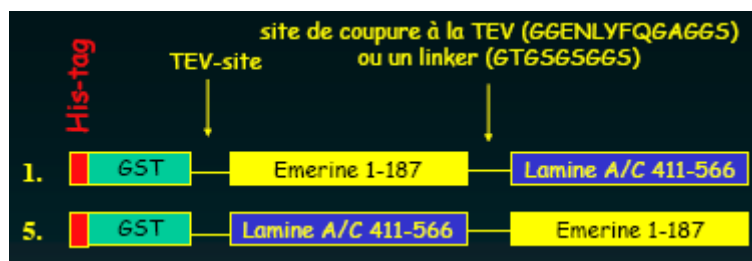


Figure 51 : Schéma des deux constructions d'Emerine-Lamine réalisées par notre collaboratrice, Cecilia Ostlund à Columbia University (New York).

Cette construction est constituée d'un tag histidine, d'une fusion GST, d'un site de coupure à la TEV, de l'émerine 1-187, d'un autre site de coupure à la TEV suivi de la lamine 411-566. La protéine s'exprime de façon soluble donc nous avons mis au point la purification de la protéine. La première étape de purification consiste en une colonne d'affinité (GS4FF) pour éliminer la plupart des protéines solubles de *E. coli* (figure 52A). Après coupure à la TEV sur colonne, les protéases ainsi que la lamine sont éliminées par une étape de filtration sur gel (figure 52).

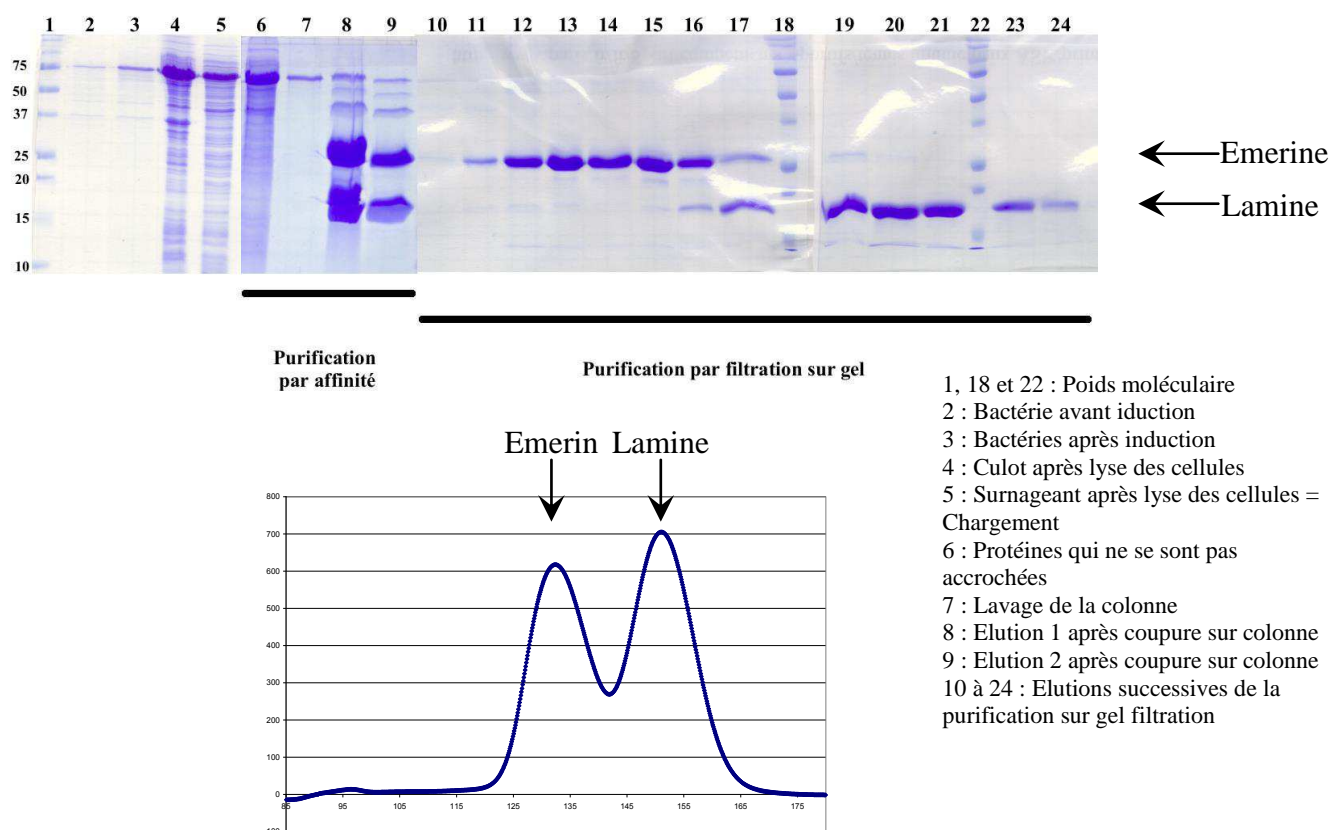


Figure 52 : A) Gel représentant les différentes étapes de d'expression et de purification de l'émerine à partir de la construction TEV#1. B) Chromatogramme de la filtration sur gel représentant la séparation de l'émerine de la lamine.

Après purification, pour six litres de culture, nous obtenons 33 mg d'émerine pure pour réaliser les premières expériences RMN.

B. Caractérisation structurale de l'émerine : étude par RMN

Une production en milieu marqué (milieu minimum contenant comme seule source d'azote du $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) a permis d'obtenir un échantillon RMN marqué ^{15}N de l'émerine. Un spectre ^1H - ^{15}N HSQC a été enregistré à 600MHz, 25°C et pH 6,3. La température de 25°C correspond à la température d'étude du domaine LEM de l'émerine par RMN (Wolff et al., 2001). La même température a été utilisée dans les deux cas d'études afin de pouvoir comparer les valeurs de déplacements chimiques.

Le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de l'émerine présente 177 pics qui correspondent aux corrélations ^1H - ^{15}N (figure 53). Ces corrélations correspondent à celles des groupements amides du squelette de la protéine (soit un pic par résidu sauf pour les prolines) et aux chaînes latérales des asparagines, glutamines, tryptophanes et arginines. Le nombre de pics attendu pour l'émerine est de 196. L'écart entre le nombre de pics observés et celui attendu peut être dû à une superposition des pics, un échange chimique entre les amides du squelette et l'eau, ou à des échanges conformationnels qui peuvent élargir les raies et diminuer ainsi l'intensité des signaux dans les régions en échange. La zone centrale du spectre présente un grand nombre de pics, suggérant la présence de régions déstructurées dans ce fragment d'émerine.

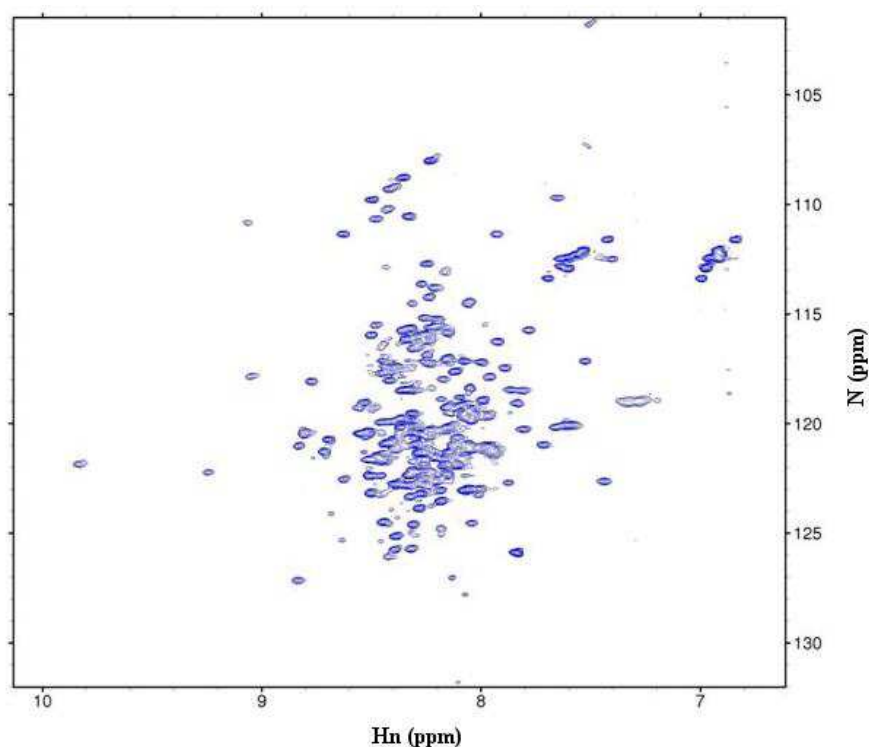


Figure 53 : ^1H - ^{15}N HSQC de l'émerine enregistrées à 600MHz et à 25°C. La concentration en protéine est de 0,2 mM dans un tampon 50mM Tris, 150 mM NaCl, pH 6,3.

Une expérience permettant de mesurer de nOes hétéronucléaires ^1H - ^{15}N (nuclear Overhauser effects) a été réalisée (figure 54). Celle-ci permet de distinguer les parties flexibles de la protéine, telles que les boucles exposées ou les parties déstructurées, de la

partie repliée. Les nOes ^1H - ^{15}N dépendent uniquement des mouvements rapides de la liaison Hn-N dans le référentiel de l'aimant (de l'ordre de la picoseconde à la nanoseconde) et de la distance Hn-N (qui est fixe), mais ils sont indépendants des protons environnants. La mesure de ces effets dans deux conditions d'irradiations radiofréquence en saturant ou non le spin observé, permet d'avoir une estimation des mouvements des NH de la protéine. Les régions dans lesquelles les pics ont une valeur positive sont considérées comme rigides ou relativement flexible (boucles) et les régions dans lesquelles les pics ont une valeur négative, correspondent aux régions déstructurées de la protéine.

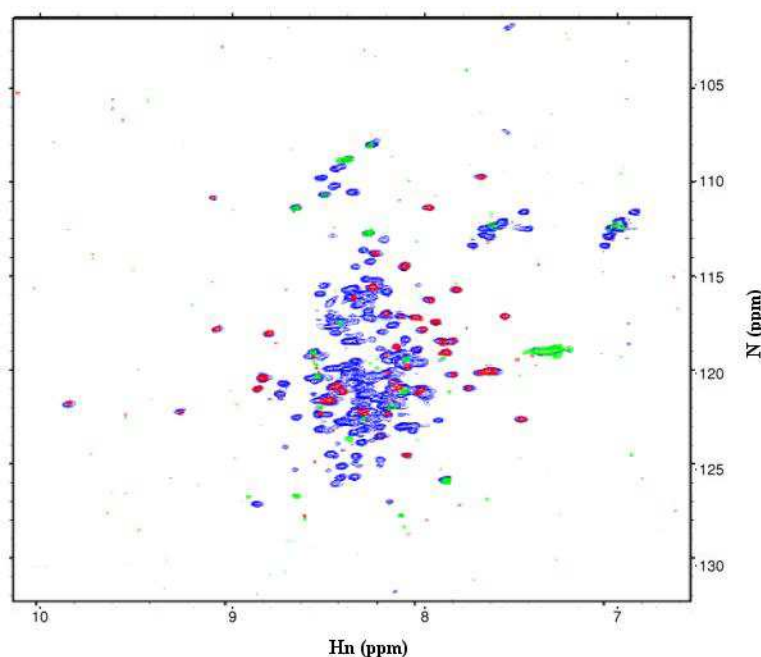


Figure 54 : Superposition du spectre ^1H - ^{15}N HSQC et du spectre de nOes hétéronucléaires ^1H - ^{15}N de l'émerine enregistrées à 600MHz et à 25°C. En bleu, le spectre ^1H - ^{15}N HSQC, en rouge, les pics correspondants à des résidus structurés, en vert, les pics correspondants à des résidus déstructurés.

Cette expérience nous a permis de comptabiliser seulement 56 résidus dans des régions relativement rigides ou flexibles, le reste des résidus correspondant à des régions dans lesquelles il existe des mouvements de l'ordre de la picoseconde à la nanoseconde. Ces 56 résidus correspondent probablement au domaine LEM de la région N-terminale de l'émerine.

En conclusion, la partie 1-187 de l'émerine n'est pas repliée, donc deux solutions sont envisageables : soit cette protéine a besoin d'un de ses partenaires biologiques pour se replier soit elle a besoin de toute sa région nucléoplasmique pour se replier. Afin de répondre à la première hypothèse, nous voulions vérifier les interactions avec la lamine décrites dans la littérature par des expériences biochimiques puis regarder l'effet de l'ajout de lamine sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de l'émerine.

C. Interaction émerine-lamine par pulldown

L'expérience de GST pulldown consiste à accrocher un fragment de la lamine fusionnée à la GST sur une colonne d'affinité pour la GST (GS4B), puis à ajouter l'émerine. Un contrôle négatif est réalisé avec la GST seule (sans lamine). Après différents lavages, s'il y a interaction entre la lamine et l'émerine, cette dernière reste accrochée à la colonne. Les protéines sont observées sur gel d'électrophorèse.

Les fragments de lamine utilisés sont : 411-553 qui correspond au domaine globulaire seul, 411-572 qui correspond à la partie C-terminale de la lamine C et 411-646 qui correspond à la partie C-terminale de la lamine A mature.

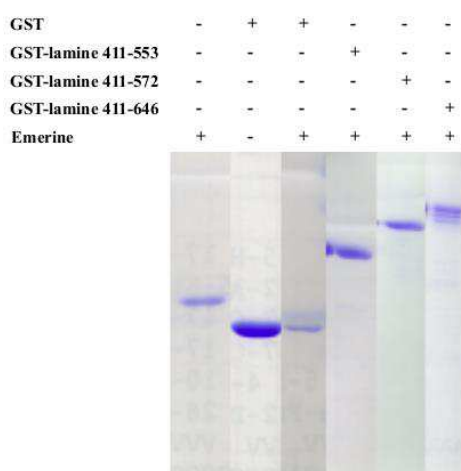


Figure 55 : Gels du GST pulldown entre différents fragments de lamine et l'émerine. Ces expériences ont été analysées sur gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes, révélés au bleu de Coomassie.

Le gel de la figure 55 montre que les différents fragments de lamines utilisés n'interagissent pas avec l'émerine 1-187 dans nos conditions expérimentales.

4. Analyse de l'interaction entre la lamine de type A et SREBP1

L'interaction entre SREBP1 et les lamines de type A a été mise en évidence par l'équipe de S. Shackleton *in vivo* et *in vitro* (Lloyd et al., 2002). Cette interaction met en jeu la partie 227-487 de SREBP1 qui contient le motif de liaison à l'ADN et la région 389-664 de la prélamine A. De plus, le groupe de S. Shackleton a réalisé des tests de liaison utilisant des plus petits fragments de SREBP1, et en particulier a obtenu des résultats positifs avec le domaine de liaison à l'ADN (S. Shackleton, communication personnelle). Ce groupe nous a donc envoyé le plasmide permettant l'expression de la région 320-405 de SREBP1, correspondant au domaine de liaison à l'ADN cristallisé (Parraga et al., 1998), afin que nous testions l'interaction de ce fragment avec nos peptides de lamine. Notre objectif est de

délimiter la région d'interaction de SREBP1 sur la lamine. Dans cette optique, nous avons testé différentes constructions de la région C-terminale des lamines de type A avec le motif de liaison à l'ADN de SREBP1 (résidus 320 à 405) par GST pulldown et RMN.

A. *Interaction in vitro par pulldown*

Les fragments de lamine utilisés pour l'expérience de GST pulldown sont : 411-553 qui correspond au domaine globulaire seul, 411-572 qui correspond à la partie C-terminale de la lamine C et 411-646 qui correspond à presque toute la partie C-terminale de la lamine A mature.

Le gel de la figure 56 montre que les différents fragments de lamines utilisés n'interagissent pas avec SREBP1 320-405 dans nos conditions expérimentales.

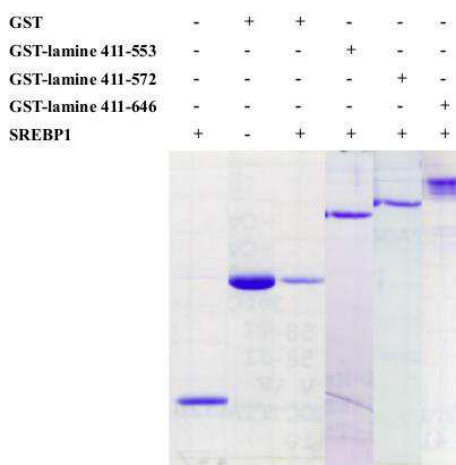


Figure 56 : Gels du GST pulldown entre différents fragments de lamine et SREBP1 avec 200 mM de NaCl. Ces expériences ont été analysées sur gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes, révélés au bleu de Coomassie.

En revanche, notre collaboratrice I. Duband-Goulet a réalisé cette expérience de GST pulldown avec deux fragments de GST-lamine 411-646 et 411-664 et le même fragment de SREBP1. Elle a observé une interaction entre SREBP1 et la lamine A mature ainsi que la prélamine A mais avec de faible concentration en sel (100 mM, figure 57). Pour confirmer ces résultats, nous avons ensuite réalisé des expériences RMN.

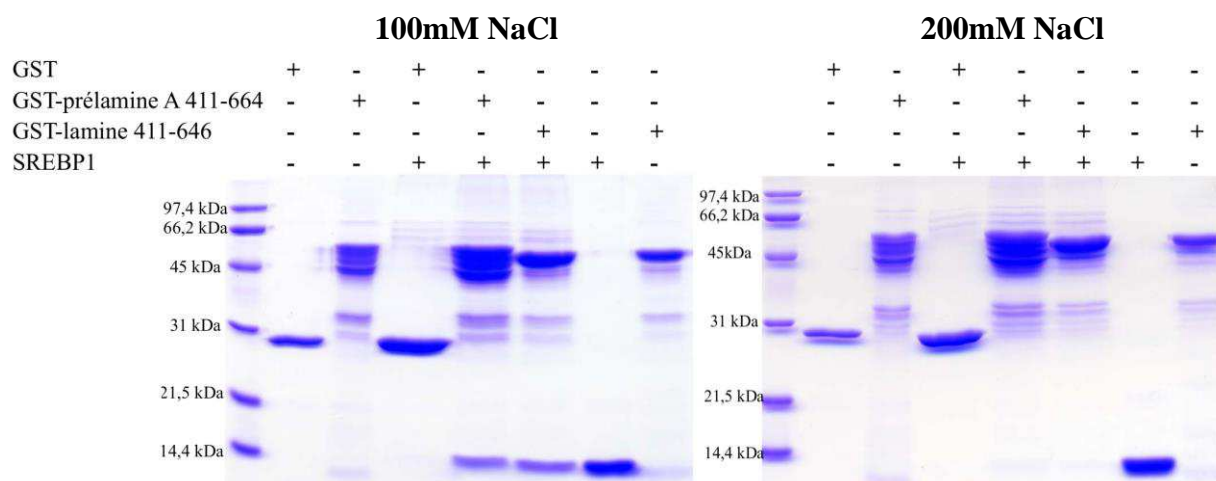


Figure 57 : Gels du GST pulldown entre la lamine A mature ou la prélamine A et SREBP1 avec 100 mM ou 200 mM de NaCl. Ces expériences ont été analysées sur gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes, révélés au bleu de Coomassie. Pour chaque gel, le poids moléculaire est dans la première colonne.

B. Cartographie de l'interaction lamine/SREBP1

Dans les expériences de GST-pulldown, la présence de GST peut gêner l'interaction entre les deux partenaires. Nous avons vérifié ce point en utilisant la RMN. La liaison de SREBP1 a été testée avec les fragments 411-553 et 411-646 de la lamine par RMN. Comme le montre la superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de la figure 58, correspondant à la lamine 411-646 seule ou en présence de 2 équivalents de SREBP1, l'addition de SREBP1 induit des changements de déplacements chimiques d'un certain nombre de corrélations Hn-N (supérieur à l'écart type de l'ensemble des écarts significatifs de tous les résidus : 0,00143). Ces changements sont identiques que ce soit pour la lamine 411-553 ou la lamine 411-646 donc je ne présenterai ici que les résultats pour la lamine 411-646.

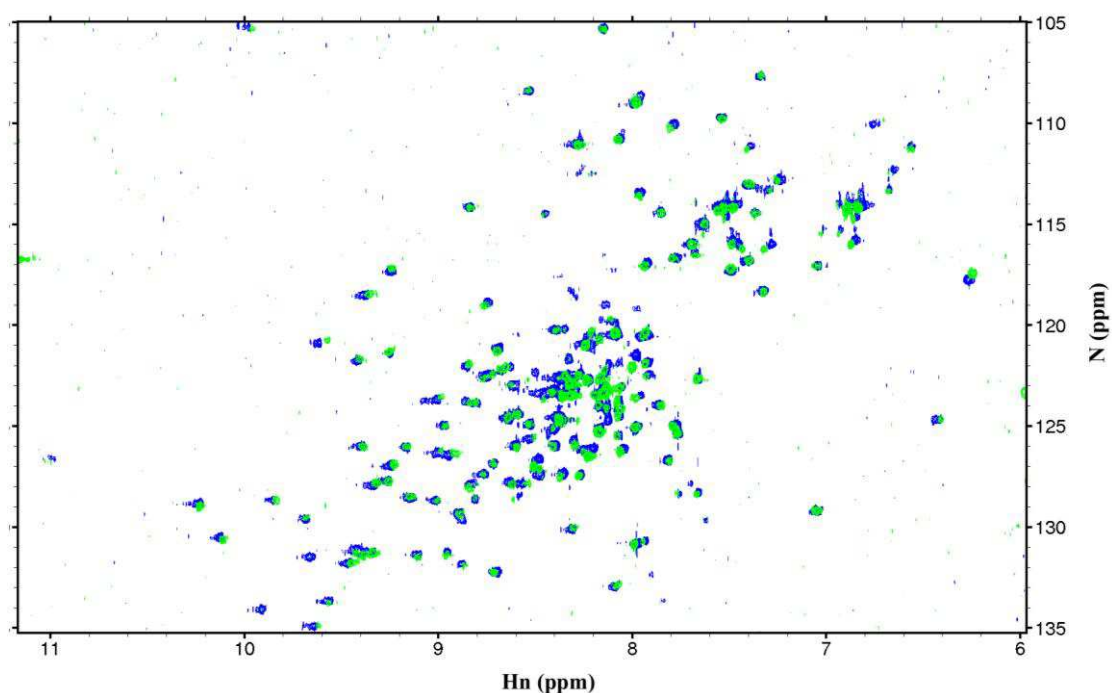


Figure 58 : Interaction de la lamine 411-646 avec SREBP1. Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de la lamine 411-646 sans SREBP1 (bleu) et avec 2 équivalents SREBP1 (vert).

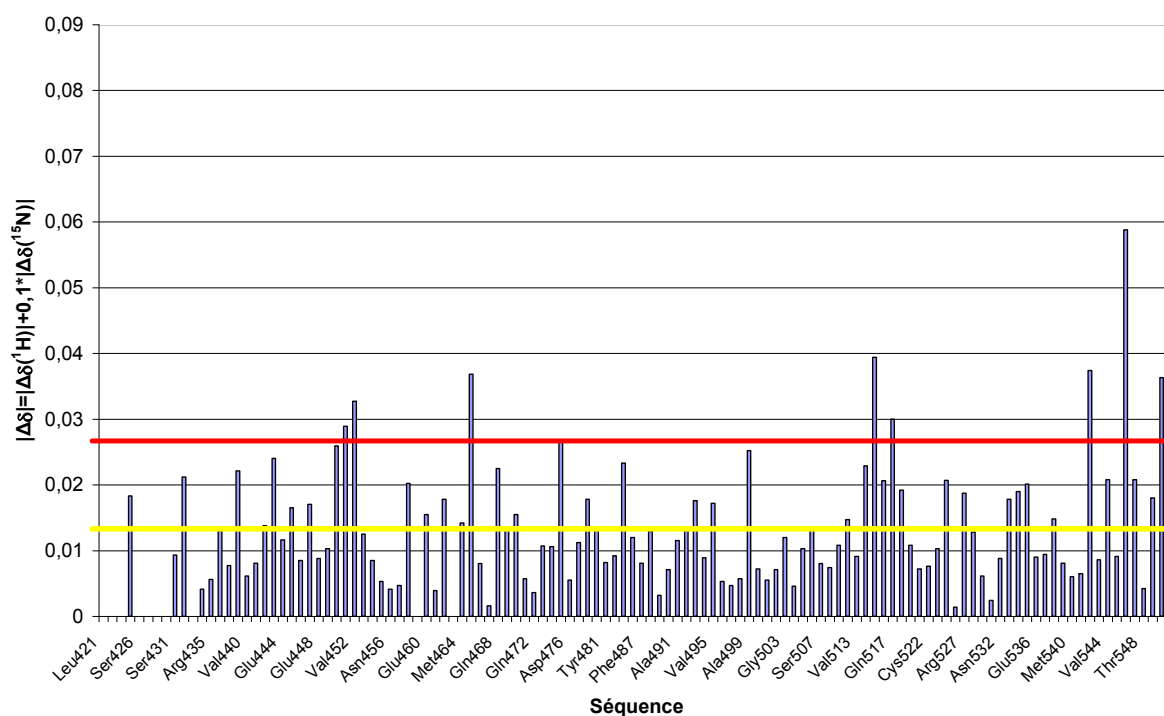


Figure 59 : Ensemble des variations des déplacements chimiques des résidus 411-553 de la lamine 411-646 après addition de 2 équivalents de SREBP1. Ligne rouge : 2 écart-types, ligne jaune : écart-type.

L'ensemble des variations de déplacements chimiques induites par la présence de SREBP1 est représenté sur la figure 59.

Les variations de déplacements chimiques des corrélations Hn-N sont faibles, similaires à celles observées avec un autre partenaire de la lamine, l'émerine donc on peut penser qu'il s'agit d'un effet dû à la dilution plus qu'à une véritable interaction.

En conclusion, d'autres expériences sont nécessaires pour documenter une éventuelle interaction lamine-SREBP1 fortement dépendante de la concentration en sel.

III. Caractérisation d'un mutant des lamines de type A : R439C

1. Article: The FPLD-associated R439C LMNA mutation causes lamin oligomerisation that interferes with DNA binding (submitted to Human Mutation)

Le groupe des Pr P.M. Steijlen et F.C.S. Ramaekers de l'hôpital de Maastricht a découvert une nouvelle mutation localisée dans le domaine globulaire C-terminal de la lamine A/C et qui entraîne une forme de FPLD avec un fonctionnement anormal des muscles et des anomalies du squelette typiques des laminopathies progéroides. Plusieurs autres mutations connues de la lamine A/C sont responsables d'une FPLD. Ces mutations sont principalement localisées dans la partie C-terminale de la lamine, notamment dans le domaine globulaire. Elles ne déstabilisent pas la structure tridimensionnelle de l'Ig-fold (Krimm et al., 2002). En revanche, elles sont positionnées sur une surface exposée au solvant du domaine constituée principalement de résidus chargés positivement, et impliquée dans l'interaction de l'Ig-fold avec l'ADN (Stierle et al., 2003). Elles diminuent la charge positive de cette surface conservée chez les lamines A et B. C'est pourquoi il a été proposé que ces mutations FPLD soient à l'origine d'une perte d'interaction entre la lamine de type A et certains de ses partenaires comme l'ADN. On peut se demander si notre nouvelle mutation a le même mécanisme d'action car elle induit non seulement une lipodystrophie mais aussi des phénotypes supplémentaires à la FPLD.

J'ai montré que la mutation R439C, comme les autres mutations causant une lipodystrophie, n'a pas d'impact sur la structure tridimensionnelle et la stabilité thermique du domaine Ig-fold C-terminal. Puis j'ai étudié l'impact de l'introduction d'une cystéine supplémentaire sur les propriétés d'oligomérisation de l'Ig-fold. Le domaine C-terminal de la lamine contient déjà une cystéine en position 522 et la formation d'un dimère de lamine par cette cystéine permet l'interaction de la lamine avec l'ADN *in vitro* (Stierle et al., 2003). L'introduction d'une cystéine supplémentaire entraîne la formation d'oligomères plus complexes de lamine A/C par l'intermédiaire des ponts disulfures alors que les autres mutations FPLD de la lamine ne modifient pas le profil de dimérisation. Je me suis intéressée à ce phénomène et par gel retard, j'ai caractérisé l'impact de la formation de ces oligomères sur l'interaction de la lamine A/C avec l'ADN. Mais cette oligomérisation est-elle réelle *in vivo* ? Les premières expériences réalisées par nos collaborateurs à Maastricht sur les lamines de type A extraites des fibroblastes de patients en conditions non réductrices semblent confirmer cette hypothèse. Mais la formation de ponts disulfures pendant la lyse des cellules et la purification des lamines est un facteur limitant. Cette difficulté peut être contournée par l'ajout de NEM, produit bloquant les cystéines libres et donc empêchant des ponts disulfures

non présents *in vivo* de se former lors de la manipulation des lamines *in vitro*. Des expériences préliminaires utilisant le NEM pour protéger les cystéines libres après l'extraction des lamines ont déjà été réalisées par plusieurs groupes sur des lamines de différents organismes. Des dimères de lamine ont été identifiés, mais le blocage de la formation des ponts disulfures n'étant réalisé qu'après l'extraction des lamines, celles-ci ont potentiellement le temps de s'oxyder *in vitro* (Dessev et al., 1990; Lam and Kasper, 1979). J'ai à mon tour testé l'oligomérisation des lamines *in vivo* en utilisant un protocole mis au point avec Michel Toledano. Ces expériences sont en cours. Elles devraient permettre de conclure sur les conséquences de la mutation R439C sur l'oligomérisation des lamines de type A.

The FPLD-associated R439C *LMNA* mutation causes lamin oligomerisation that interferes with DNA binding

Valerie L.R.M. Verstraeten,^{1, 2} Sandrine Caputo,³ Arthur van den Wijngaard,⁴ Isabelle Duband-Goulet,⁵ Sophie Zinn-Justin,³ Miriam Kamps,^{1, 2, 6} Helma J.H. Kuijpers,⁶ Cecilia Östlund,⁷ Howard J. Worman,⁷ Carlo L.M. Marcelis,⁸ Michel van Geel,^{1, 2} Peter M. Steijlen,^{1, 2} Frans C.S. Ramaekers,^{2, 6, 9} Jos L.V. Broers,^{6, 9, 10} and Maurice A.M. van Steensel^{1, 2}

¹Department of Dermatology and ⁴Department of Clinical Genetics, University Hospital Maastricht, the Netherlands.

²Research Institute for Growth and Development (GROW), University of Maastricht, the Netherlands. ³Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, France. ⁵Institut Jacques Monod-CNRS UMR

7592, Universités Paris6/Paris7, France. ⁶Department of Molecular Cell Biology, University of Maastricht, the Netherlands. ⁷Departments of Medicine and of Anatomy and Cell Biology, College of Physicians and Surgeons,

Columbia University, NY, USA. ⁸Department of Clinical Genetics, Radboud University Nijmegen Medical Centre, the Netherlands. ⁹Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM), University of Maastricht, the Netherlands.

¹⁰Department of Biomedical Engineering, Biomechanics and Tissue Engineering, Eindhoven University of Technology, the Netherlands.

Corresponding author:

Valerie Verstraeten, MD

Department of Dermatology

University Hospital Maastricht

PO Box 5800

6202 AZ Maastricht

The Netherlands

Tel: + 31433875641

Fax: + 31433877293

E-mail: vve@sder.azm.nl

ABSTRACT

Dunnigan-type familial partial lipodystrophy (FPLD) is a laminopathy characterised by an aberrant fat distribution and a metabolic syndrome. We present a distinctive form of FPLD with clinically abnormal muscle function and skeletal abnormalities resembling those found in progeroid laminopathies. The phenotype is caused by a novel heterozygous missense mutation in the *LMNA* gene leading to the p.R439C substitution and affecting the C-terminal globular domain of lamins A and C. Cultured patient fibroblasts revealed honeycomb lamin A/C formations in a significant percentage of nuclei. At the molecular level, the three-dimensional structure and thermal stability of the C-terminal domains of mutant and wild-type lamins A/C are similar. However, the introduction of an additional cysteine provokes the formation of disulfide-mediated lamin A/C oligomers, as seen for both the recombinant C-terminal domain and full-length lamin A/C purified from patient fibroblasts. Such oligomerisation affects the interaction properties of the C-terminal domain with DNA as shown by gel retardation assays. When compared to wild-type lamin A, the *in vivo* stability of the nuclear lamina and nucleoplasmic network of the R439C mutant is decreased as concluded from photobleaching studies in GFP-lamin A expressing cells. In conclusion, the novel mutation affects the oligomerisation properties of A-type lamins, their interaction with DNA, and as a result their dynamic behaviour *in vivo*, suggesting a new pathogenetic mechanism for laminopathies.

KEY WORDS

Laminopathy, lipodystrophy, Dunnigan, disulfide-mediated oligomerisation

INTRODUCTION

Mutations in the *LMNA* gene are associated with a spectrum of disorders called laminopathies (Burke and Stewart, 2002), affecting many organs and tissues such as bone, fat, heart, the nervous system, skeletal muscle and skin. Lamins are intermediate filament proteins with N- and C-terminal regions flanking an α -helical rod domain. This structure forms coiled-coil dimers which polymerise into a network of filaments lining the nucleoplasmic side of the inner nuclear membrane (Hutchison, et al., 2001). The capacity of nuclear lamins to oligomerise further into large molecular weight complexes by disulfide bonds was suggested by studies on A- and B-type lamins performed under oxidizing conditions (Shelton, et al., 1982). The *in vivo* existence of these oligomers has been questioned, although dimers of the 67-kDa lamin stabilised by disulfide bonds could be detected in Surf Clam (*Spisula Solidissima*) oocytes (Dessev, et al., 1990). There is as yet no evidence that these lamin oligomers can exist in human cells. Lamins are not only present in the nuclear lamina but are also found in the nucleoplasm as part of intra-nuclear tubes and as scaffolding proteins (Broers, et al., 1999). They play an essential role in the maintenance of the structural integrity of the nucleus and in the regulation of chromatin structure and function (Goldman, et al., 2002; Hutchison, 2002). The study of human laminopathies has shed further light on lamin biology. Mutations in the rod domain are mainly associated with muscle diseases including Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD) (Bonne, et al., 1999), limb girdle muscular dystrophy (Muchir, et al., 2000), and dilated cardiomyopathy (Fatkin, et al., 1999), while mutations affecting the C-terminal globular region cause either muscle diseases or familial partial lipodystrophy (FPLD) (Cao and Hegele, 2000) and progeroid phenotypes (Novelli, et al., 2002; Plasilova, et al., 2004).

FPLD (MIM# 151660) is characterised by wasting of fat in the extremities and gluteal area starting around puberty (Haque, et al., 2003), accompanied by excess fat deposition in the face, neck and often labia majora (Garg, et al., 2001; Hegele, et al., 2000). Most patients develop diabetes mellitus type II, acanthosis nigricans, dyslipidemia and hypertension (Hegele, et al., 2000). The R482W/Q mutations in *LMNA* that cause FPLD (Cao and Hegele, 2000) result in nuclear abnormalities, such as honeycomb formation of the lamin network, nuclear blebbing and hypersensitivity to heat shock (Vigouroux, et al., 2001). These mutations do not significantly destabilize the three-dimensional structure of the C-terminal globular domain but decrease the positive charge of a solvent-exposed surface conserved in all types of lamins (Krimm, et al., 2002). Fluorescence loss-of-intensity after photobleaching (FLIP) assays showed that these FPLD-associated mutations may have a significant impact on lamin polymerisation (Broers, et al., 2005).

Here, we report a Dunnigan-type familial partial lipodystrophy with skeletal abnormalities resembling those in progeroid syndromes. In affected family members, we found a novel heterozygous *LMNA* missense mutation that affects nucleotide c.1315 (C>T) in exon 7, resulting in an arginine to cysteine substitution (p.R439C) in the C-terminal globular domain of the A-type lamins. We examined the impact of this mutation on the structural integrity of the nuclear lamina and on the interaction of A-type lamins with DNA.

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls.

The index patients are a 50-year-old Dutch woman and her 25-year-old daughter. Blood samples were collected from the index patients, an affected sister of the mother and her daughter in tubes containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), and informed consent was obtained. As controls, samples from 150 unrelated individuals of Dutch origin were examined.

Mutation analysis.

Genomic DNA was extracted from whole blood by standard procedures using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Leiden, the Netherlands). The coding exons of *LMNA*, including the splice-junctions, were amplified by PCR. PCR reactions (50µl) contained 1x Taq buffer (Invitrogen, Breda, the Netherlands), 0.2 mM dNTPs, 100ng of each primer and 1.0 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Breda, the Netherlands). PCR conditions were; 30s 94°C, 30s 62°C, 60s 72°C for 35 cycles, initiated by 90s at 94°C and terminated by 420s at 72°C. PCR products were purified in 50µl elution buffer (Tris 10mM, PH 8.0) with a MultiScreen-PCR filter plate (Millipore, Amsterdam, the Netherlands) or Qiagen PCR purification kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands). Subsequently, 1µl was directly sequenced with the big dye terminator V1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Fostercity, CA, USA) using the PCR primers according to the specifications of the manufacturer (all primer sequences are available upon request). Sequence analysis was performed with Vector NTI software (Informax, Inc.).

Recombinant globular domain preparation

The mutant R439C A-type lamin C-terminal domain (residues 411-553) was expressed in *E. coli* strain BL21 Star (DE3) (Invitrogen) transformed with plasmid pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) that encodes glutathione-S-transferase (GST) and a thrombin cleavage site between the lamin protein and GST. The fusion protein was purified using Glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) and cleaved using thrombin protease.

NMR Spectroscopy

For NMR spectroscopy samples, contained 0.5 mM protein dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 6.3), 1 mM DTT, 1 mM EDTA, and 0.1 mM NaN₃, while 3-(trimethylsilyl) [2,2,3,3-2H⁴] propionate (TSP) was added as a chemical shift reference. All experiments were performed at 20°C on a Bruker DRX-600 spectrometer and spectra were processed with the program Xwinnmr.

Circular dichroism

For the circular dichroism studies the protein concentration used was 5 µM in a buffer of 20 mM Tris-HCl (pH 6.3) containing 0.1 mM DTT. The C-terminal domain of lamin mutant was analyzed by circular dichroism using Jobin-Ivon CD6 spectropolarimeter (Longjumeau, France). Spectra were recorded between 190 and 250 nm on a 1 ml protein sample (optical length: 1cm) at temperatures varying from 10 to 90°C.

Oligomerisation study

For the oligomerisation studies the lamin globular domain was diluted to 50 μ M in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, and 1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride containing 100 mM NaCl and 0.1% Triton X-100, and incubated at either 4°C or 37°C for different time intervals as mentioned in the text. Aliquots were solubilized in SDS-sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.3% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol and 0.05% Bromophenol Blue) with or without 1mM β -mercaptoethanol and analyzed by gel electrophoresis.

Preparation of the nuclear matrix fraction to assess disulfide bond formation in vivo

Fibroblasts from the mother obtained by skin biopsy and human control fibroblasts (NHDF α) were grown in 75 cm² culture flasks. The cells were rinsed twice with 2ml phosphate buffered saline (PBS). Extraction followed by adding 400 μ l of CSK buffer containing 100mM NaCl (Merck), 300 mM sucrose (Merck), 10mM PIPES (Sigma) (pH 6.8), 3mM MgCl₂ (Merck), 0.5% Triton X-100 (BDH Scintan) and 1.2 mM phenylmethylsulphonyl chloride (PMSC) (Merck, VWR International B.V., Amsterdam, the Netherlands). The sample was transferred to a 1.5 ml tube for 30 minutes at 0°C, mixed thoroughly every 10 minutes and centrifuged at 17 600 g during 5 minutes. Pellets were digested for 20 minutes at 20°C in 200 μ l of CSK buffer containing 50 mM NaCl and 12.5 U / ml benzonase. Subsequently, 250mM of ammonium sulfate was added for 5 minutes at 20°C. The samples were divided in two equal fractions and centrifuged for about 10 minutes at 17 600 g. The pellets containing the nuclear matrix fraction were dissolved in SDS-sample buffer with or without β -mercaptoethanol, loaded onto a 5% SDS-polyacrylamide gel and resolved at 100 Volts during 1h - 1.30 h.

Gel electrophoresis and immunoblotting

One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, Herts HP2 7DX, UK) was performed as described by Laemmli (Laemmli, 1970). Coomassie Brilliant Blue staining, as well as actin immunoblotting was performed to assess the amount of protein loaded onto the gel. Gels were run on the Mini-Protean II system from Bio-Rad Laboratories at 100 Volt for 1 hour. Proteins were blotted using a Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad Laboratories) onto nitrocellulose membranes (BA85, Schleicher and Schüll, Dassel, Germany) during 60 minutes at 100 Volts, in a buffer containing 192mM glycine (Bio-Rad Laboratories), 25mM Tris (Bio-Rad Laboratories), 20% methanol (Sigma) and 0.02% SDS (Bio-Rad Laboratories), essentially as described by Towbin et al. (Towbin, et al., 1979). The membranes were pre-incubated in blocking solution (PBS / 0.5% Triton X-100 with 5% non-fat dry milk) followed by 1 hour incubation with mouse antibody Jol-2 (dilution 1:1000), X67 (dilution 1:50), or β -actin (dilution 1:5000). As secondary antibody peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse Ig (DAKO/ITK) (dilution 1/10.000) was used and peroxidase activity was detected by chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL, USA), visualised on RX Fuji medical X-ray films (Fuji, Tokyo, Japan). Stripping of the nitrocellulose membrane was performed with the Restore Western Blot Stripping Buffer (21059, Pierce, Rockford, IL61105) for about 15 minutes. When the Jol-2 immunoreactive bands could no longer be detected, the blot was re-incubated for about 60 minutes with the X67 antibody.

Gel retardation assay

DNA preparation. A 357 bp fragment was obtained from a *Bam*HI digest of the plasmid pUC 357.4 (Duband-Goulet and Courvalin, 2000). Dephosphorylation of DNA fragments and 5'-end labeling

with ^{32}P -ATP and T4 polynucleotide kinase were performed according to standard protocols (Sambrook, et al., 1989).

Protein-DNA Interactions. Protein diluted at the indicated concentrations in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, and 1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride containing 100 mM NaCl and 0.1% Triton X-100 were incubated with radioactive DNA fragments at 4°C or RT for 3h. Protein-DNA complexes were analyzed on 4% polyacrylamide gels at an acrylamide/bisacrylamide ratio of 29/1 (w/w), in 12.5 mM Tris-HCl (pH 8.4), 95 mM glycine, and 0.5 mM EDTA. After a 1h pre-electrophoresis, samples were loaded and resolved at 80 V, by a 2h30 electrophoresis at 4°C. DNA retardation was detected by autoradiography of the dried polyacrylamide gel at -80°C, using Biomax MR film (Kodak) and an intensifying screen.

Mutant pEGFP-R439C construct and transfection of CHO cells

The cDNA plasmid encoding lamin A-EGFP (Broers, et al., 2004) served as a basis to generate the R439C mutant form of EGFP-lamin A using the Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA 94043, USA) following the manufacturer's instructions (primer sequences used are available upon request).

CHO-K1 cells were transfected overnight with a pEGFP-Lamin A R439C construct using Genejammer (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After selection for stable transfectants by geneticin (G418, 500 µg/ml, Gibco-Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) cells were subcloned to single-cell colonies by limited dilution. EGFP-expressing colonies were selected using an inverted fluorescence microscope (Zeiss) and used for further experiments.

Fluorescence loss of intensity after photobleaching (FLIP)

Fluorescence intensity in living cells was measured using a MRC600 confocal laser scanning microscope (BioRad) with an oil-immersion objective (40x, NA = 1.3). Transfected CHO-K1 cells grown on glass coverslips were exposed to a bleaching regimen, consisting of prebleach recording, bleaching, and postbleach recording as described earlier (Broers, et al., 2005). To obtain optimal bleaching, scanning was performed at a 30x zoom (vertical box recording setting, i.e. 368 x 512 pixels), equivalent to a rectangular area of 5 x 7.5 µm. This area was exposed to 15 repetitive series of 10 bleaching scans at fast (F3) scan speed using full laser power (0,8 mW). The interval between the start of each bleaching round was set at 15 s. As a result, duration of the complete bleaching regimen was approximately 230 s. The bleaching series was immediately followed by a postbleach recording with settings identical to the prebleach recordings.

Fluorescence intensities of selected cellular regions before and after bleaching were compared with Image J software (version 1.34p, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Identical regions in cells before and after bleaching were selected and the mean fluorescence intensity expressed in pixel values (1–256) was measured in these regions. The relative loss of intensity was calculated for each region after background subtraction. For each cell average intensities were measured for the following areas: lamina (nuclear membrane), intra-nuclear area without any visible structures (nucleoplasm), background area, and bleached areas. In all recordings the intensity measured in the bleached area corresponded to the background signal. From the mutant clone 20 cells with average fluorescence intensity were chosen and subjected to the FLIP regimen. Cells with very brightly fluorescent intra-nuclear aggregates were excluded, as well as cells with fluorescence intensity too low to correct for background variations.

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

Recovery of fluorescence after photobleaching (Edidin, et al., 1994) was studied using a Zeiss LSM 510 confocal microscope. Bleaching experiments were electronically controlled using LSM 510

software (release 2.01, Zeiss). Bleaching was achieved by performing 10 scans of a small, selected region of interest (part of the nucleoplasm or the lamina) at full laser power (100% transmission; 0,8 mW). Recordings of the cells with a resolution of 128x128 pixels were performed before bleaching. The average intensity of the bleached region of interest was measured at low laser power (1% transmission; 0,008 mW) at 200 ms intervals after bleaching for up to 50 seconds.

Immunohistochemical staining of cultured fibroblasts.

Skin fibroblasts were grown on glass coverslips in 12-well culture plates with DMEM-F12 (Cambrex, Verviers, Belgium), 10% fetal calf serum and 1% antibiotics (penicilline-streptomycine; GIBCO, Cat. No.15140-148). After reaching 80% confluency the cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS pH 7.4 for 15 min, followed by permeabilization in 0.1% Triton X-100 for 10 min at room temperature (RT). For staining with the LN43 antibody, cells were fixed in methanol at -20°C for 10 min. Primary antibodies (see below) diluted in PBS with 3% bovine serum albumine (BSA) were applied onto the cells for 1 h at RT. After washing in PBS, secondary antibodies were applied for 1 h at RT. Secondary antibodies used are FITC-conjugated rabbit anti-mouse Ig (1:100, DAKO, Glostrup, DK) or FITC-conjugated swine anti-rabbit Ig (1:80, DAKO, Glostrup, DK). Secondary antibodies were diluted in PBS with 3% BSA. After three final washing steps (each 5 min) in PBS, slides were mounted in 90% glycerol, 0.02 M Tris-HCl pH 8.0, 0.8% NaN₃ and 2% 1,4-di-azobicyclo-(2,2,2)-octane (DABCO; Merck, Darmstadt, Germany) containing 1 mg/ml propidium iodide (PI).

Primary antibodies used for immunofluorescence studies:

- 133A2 (mouse IgG3) was a kind gift from Dr. Y. Raymond (Montreal, Canada) and is distributed by MUBio Products BV (Maastricht, The Netherlands). It recognises lamin A and AΔ10, reacting with the epitope consisting of amino acids 598-611 (Hozak, et al., 1995). Dilution used for immunohistochemistry: 1/100.
- Ra1C (MUBio Products BV) is an affinity purified rabbit polyclonal antibody directed against the C-terminal sequence VSGSRR (position 567-572) of human lamin C (Venables, et al., 2001). Dilution used for immunohistochemistry: 1/20.
- Jol-2 (mouse IgG1) was kindly provided by Dr. C. Hutchison (Durham, UK). The antibody reacts with an epitope (amino acids 464-572) in the C-terminal domain of lamins A, AΔ10 and C (Dyer, et al., 1997). Dilution used for immunohistochemistry: 1/20; for immunoblotting: 1/1000.
- 119D5-F1 (mouse IgG1) (MUBio Products BV) directed against an epitope located C-terminal of residue 231 in lamin B1 (Broers, et al., 2002; Hozak, et al., 1995; Machiels, et al., 1995). Dilution used for immunohistochemistry: 1/100.
- Lamin B1 is an affinity-purified rabbit polyclonal antibody to lamin B1, kindly provided by Dr J.C. Courvalin (INSERM, Paris, France) (Chaudhary and Courvalin, 1993). Dilution used for immunohistochemistry: 1/100; dilution used for immunoblotting: 1/100.
- LN43 (mouse IgG1) (MUBio Products BV), recognizes lamin B2 and does not cross react with lamin B1 or A-type lamins (Bridger, et al., 1993). The antibody was kindly provided by Dr. E.B. Lane (Dundee, U.K.). LN43 was used as undiluted culture supernatant in immunohistochemistry. Dilution used for immunohistochemistry: 1/5.
- NCL-Emerin (mouse IgG1) (clone 4G5; Novocastra, Newcastle, UK) directed against a 222 amino acid fragment near the N-terminus of the emerin protein (Bione, et al., 1994; Nigro, et al., 1995). Dilution used for immunohistochemistry: 1/50.
- A polyclonal rabbit antibody α-PA kindly provided by Dr. Sinensky, and directed against the 15 amino acids of prelamin A which are proteolytically removed during the farnesylation-dependent processing step (Sinensky, et al., 1994). Dilution used for immunohistochemistry: 1/200.

- X67 (mouse IgG1) kindly provided by Dr. G. Krohne (Würzburg, Germany) recognizing amino acids 1-28 at the N-terminus of lamins A, AΔ10 or C. Dilution used for immunoblotting: 1/50.
- β-actin (mouse IgG1) (clone AC-15; Sigma, Saint Louis, Missouri, 63103 USA) recognizing a slightly modified β-cytoplasmic actin N-terminal peptide. Dilution used for immunoblotting: 1/5000.

Confocal laser scanning microscopy.

Fluorescent samples were imaged using a Bio-Rad MRC600 confocal microscope (Bio-Rad Laboratories Ltd, Hemel Hempstead, UK), equipped with an air-cooled Argon–Krypton mixed gas laser and mounted onto an Axiophote microscope (Zeiss), using oil-immersion objectives (40x, NA 1/3 D1.3 or 63x, NA 1/3 D1.4). The microscope was used in the dual parameter set-up, according to the manufacturer's specifications, using dual wavelength excitation at 488 and 568 nm. Emission spectra were separated by the standard sets of dichroic mirrors and barrier filters. Optical sections were recorded in the Kalman filtering mode using 5–8 scans for each picture. Z-series were generated by collecting a stack consisting of optical sections using a step size of 0.18 μm in the z-direction. The Huygens System image restoration software (Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, The Netherlands) was used to improve the effective resolution of some of the confocal images and to reduce background noise. For this purpose a maximum likelihood estimation algorithm (Shepp and Vardi, 1982) was used.

Total cell lysate preparation for gel electrophoresis and immunoblotting

Cells were grown in 75cm² culture flasks and harvested by scraping with a rubber police man after one wash with PBS containing 0.5mM protease inhibitor PMSC, in 200μl ice-cold lysis buffer containing 62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 12.5% glycerol, 2% NP40, 2.5 mM PMSC, 1.25 mM EDTA, 12.5 μg/ml leupeptin and 50 μg/ml trasylol. Cell suspensions were kept on ice for 30 minutes, mixed every five minutes, diluted 1:1 with SDS-sample buffer, boiled for 4 minutes and stored at -20 °C until use. For the analyses of these samples 10% polyacrylamide gels were used.

RESULTS

Clinical characteristics of the index patients.

A 50-year-old woman and her 25-year-old daughter presented with complaints of abnormal fat distribution. The mother reported a generalised progressive wasting of fat, complaints of lowered exercise capacity and muscle aches after mild exercise such as walking up stairs. Her medical history included hypercholesterolemia and transient ischemic attacks. Her teeth had all been drawn because of advanced caries caused by dental crowding. The daughter presented with the same abnormal fat distribution. She had noticed a thickening of the skin in the inguinal and axillary folds around menarche, which occurred at eleven years of age. Menses were regular until fourteen years of age, becoming irregular afterwards. Oral contraceptives were prescribed to no avail. Breast development reportedly became apparent around age seventeen and remained limited. Like her mother, she had complaints of muscle aches after mild exercise affecting both lower and upper limbs. Several permanent molars had been removed because of crowding. Upon clinical examination we noticed paucity of adipose tissue in the gluteal area and the extremities in both subjects. There was sparse adipose tissue in the breasts, with mammary development at Tanner stage 2-3 (Figure 1A). Accumulation of adipose tissue in the face, neck and labia majora was evident. Both patients had sloping shoulders and a seemingly masculine build with pronounced thigh and upper arm musculature (Figure 1B). The daughter presented with a gray papillomatous thickening of the skin in the axillary and inguinal folds, consistent with acanthosis nigricans. Both subjects had a normal blood pressure, while an older affected sister was found to be hypertensive. Muscle strength, sensibility and coordination were normal. Electromyography revealed minor myopathic changes in the mother. However, biopsy of the m. vastus lateralis showed no myopathic changes and a normal variation in fiber thickness. Cardiac ultrasound and electrocardiography were performed in both subjects and revealed a minor sinus arrhythmia in the daughter. Abdominal ultrasound showed no evidence for polycystic ovaries but revealed a hepatic steatosis in both subjects. Radiography of the clavicles and hands revealed resorption of the distal part of the left clavicle in the daughter (Figure 2B, arrow). Radiography of the mother's skull showed a vertical skull base (Figure 2A, arrow) and irregularities of the occipital bone (Figure 2A), which may be the consequence of Wormian bones. Fasting insulin and C-peptide levels were elevated in both subjects, suggesting insulin resistance although fasting glucose levels were still normal. Aside from the expected FPLD-related alterations in triglycerids and cholesterol, their liver enzymes, fasting leptin and sex hormone levels were normal.

Mutation analysis of the LMNA gene

Sequence analysis of the *LMNA* coding region revealed a heterozygous mutation c.1315C>T (p.R439C) in exon 7, thereby introducing a second cysteine in the C-terminal globular domain of A-type lamins. The mutation was detected in both subjects, a sister of the mother and her daughter.

Position of the affected R439 residue in the C-terminal globular domain

The three-dimensional structure of the A-type lamin C-terminal Ig-fold (amino acid residues 411-553) as determined by NMR spectroscopy shows that the affected residue R439 is located in a loop (residues 436 to 441) connecting β -strand 1 and β -strand 2 (Figure 3A) (Krimm, et al., 2002). C522, the only cysteine present in the native C-terminal fold, is situated on the opposite site of the globular domain (Figure 3A). R439 is solvent accessible, similar to the other FPLD causing residues of the C-terminal Ig-fold, though located more than 10 Å from these residues (Figure 3B-C). The region commonly affected in FPLD (e.g. residues R482, K486 and G465) corresponds to a surface highly conserved in A- and B-type lamins, as illustrated in Figure 3B and 3C by the dark

blue color. R439 is only conserved in A-type lamins.

Stability and structure of the R439C mutant Ig-domain

The evolution of the circular dichroism spectrum of the *E. coli*-produced R439C mutant A-type lamin C-terminal Ig-like peptide (residues 411-553) as a function of temperature shows that the denaturation temperature of the R439C mutant is 58°C (Figure 4A-B). This value is close to the denaturation temperature of the wild-type Ig-like domain (62°C) (Figure 4B). Analysis of the NMR proton spectra of the wild-type and R439C mutant peptides revealed no significant differences in the three-dimensional structures of both wild-type and mutant Ig-like domains (Figure 4C).

Oligomerisation of the R439C mutant Ig-domain

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the *E. coli*-produced wild-type and R439C mutant Ig-like C-terminal globular domain of lamins A/C (residues 411-553) shows that the wild-type Ig-like peptide is able to form dimers under non-reducing conditions, but does not oligomerise further (Figure 5A-B). In contrast, under these conditions the R439C mutant Ig-like C-terminal globular domain demonstrates extensive oligomerisation at 4° and at 37°, represented by multiple bands with decreasing mobility in the gel (Figure 5B-C). Under reducing conditions, the observed dimerization of the wild-type lamin A/C (Figure 5A, lane 2) or oligomerisation of the R439C mutant peptide did not take place (Figure 5C, lane 7). Oligomerisation is therefore hypothesized to be due to disulfide bond formation implicating residue C522 for the wild-type Ig-like peptide, and both residues C522 and C439 for the mutant R439C peptide.

The oligomerisation of full-length R439C lamins A/C

The nuclear matrix fraction was isolated from the mother's fibroblasts (passage 6) and unrelated human control fibroblasts (NHDFα, passage 6) and dissolved in sample buffer with or without β-mercaptoethanol. After immunoblotting with the Jol-2 antibody (Figure 5D; lanes 1,2) and the X67 antibody (Figure 5D; lanes 3-5) immunoreactive lamin A/C protein bands could be detected in the high molecular weight region of the patient samples (Figure 5D; lane 1,3) in addition to the protein bands representing lamins A and C at the bottom of the gel. The higher bands likely reflect the oligomerisation of A-type lamins, as already suggested in the *in vitro* experiment using recombinant A-type lamin Ig-fold domain (Figure 5C). Addition of β-mercaptoethanol showed that these oligomers were based on disulfide bonds (Figure 5D; lane 5). The control fibroblasts showed only weak bands in this region of the gel and only with the Jol-2 antibody (Figure 5D; lane 2, 4).

DNA interaction studies with the R439C mutant Ig-domain

Gel retardation assays were performed to compare the DNA binding capacity of the mutant R439C to the wild-type Ig-like lamin A/C domain. The mutant monomer, like its wild-type counterpart, does not bind DNA (data not shown). After dimerisation or oligomerisation, both wild-type and mutant Ig-like domains bind naked DNA, but the gel retardation profiles are different. Mainly qualitative differences in the interactions can be observed. Figure 5E illustrates that after 2,5 hours of dimerization at 37°C the wild-type Ig-like domain forms at least 4 distinct complexes with DNA visible as discrete bands on the gel. At the highest peptide concentrations, 3 to 4 dimers are bound to the DNA fragment and 32 molar excess of peptide is sufficient to bind all DNA (Figure 5E, lane 4). The mutant has been studied at 4°C instead of 37°C, since the large oligomers formed at 37°C (Figure 5B, lane 4) would impede the electrophoretic resolution of the DNA/Ig-peptide complexes. The complexes formed with the mutant peptide (previously oligomerised at 4°C for twenty-four hours) after three hours' incubation with 357bp double strand DNA at 4°C migrate as a smear

(Figure 5G) instead of discrete bands as obtained with the wild-type Ig-like domain under similar conditions (Figure 5F). In addition, at the highest peptide concentration, the mutant peptide/DNA complexes largely fail to enter the gel (Figure 5G, lanes 4 and 5).

Photobleaching studies on EGFP-labeled R439C mutant lamin A

Because of the formation of R439C mutant lamin oligomers that affect DNA-interaction *in vitro*, we investigated the consequences for polymerisation and stability of the lamin networks *in vivo*. In the fluorescence loss-of-intensity after photobleaching (FLIP) study, pEGFP-R439C lamin A was transfected into CHO cells and the stability of the lamin A network was examined in the lamina and in the nucleoplasm (Figure 6A/B). At the lamina, a 30% loss of fluorescence intensity of mutant R439C lamin A could be detected ($P < 3 \times 10^{-5}$, Student's *t* test). An even larger fraction of the fluorescence intensity was lost in the nucleoplasm (60%) ($P < 2 \times 10^{-8}$, Student's *t* test). These findings are similar to the data previously obtained in a FLIP assay on pGFP-R482W lamin A transfected CHO cells (Broers, et al., 2005), but the lamin A R439C mutant led to a significantly larger loss of intensity in the lamina (Figure 6C). In wild-type pGFP-lamin A transfected CHO cells only a minor loss of fluorescence intensity in the lamina (<10%) and in the nucleoplasm (about 15%) could be observed (Broers, et al., 2005).

In the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) assay, pEGFP-tagged wild-type lamin A and pEGFP-R439C lamin A were transfected into CHO cells. Nuclei were examined for recovery of fluorescence within the bleached area. The fraction of fluorescence recovered in the nucleoplasm was more pronounced for the R439C mutant compared to the wild-type (Figure 7), however not significant ($P < 0.19$, Student's *t* test). Furthermore, when compared to wild-type, a higher fluorescence recovery rate was found in the lamina of R439C lamin A transfected CHO cells. These findings support the FLIP data of the R439C lamin A mutant.

Immunohistochemical lamin staining patterns

Cultured skin fibroblasts of the mother were used at passage 3 for immunohistochemical analyses. Several nuclei were irregularly shaped with foldings and indentations. About 20% of the nuclei revealed intra/trans-nuclear membrane invaginations and evident donut-shaped nuclei could be detected in a small percentage of nuclei (<1%). Nuclear blebbing was found in 6.5% of all patient fibroblasts; honeycomb structures were encountered in about 10% of the nuclei. In contrast, normal human control fibroblasts (NHDFa, passage 5) showed nuclear blebbing and honeycomb figures in about 2% and 3%, respectively. A-type lamins (Figure 8A-C) as well as emerin (Figure 8D) were normally expressed at the nuclear lamina. However, in the nuclear protrusions containing chromatin lamin B1 (Figure 8E) was absent and lamin B2 (Figure 8F) expression was reduced. Prelamin A expression could not be detected (data not shown).

Immunoblotting to assess expression levels of A-type lamins

Skin fibroblasts from the mother (Figure 8G, lane 2) and a control human fibroblast cell line (NHDFa) (Figure 8G, lane 1) were used to assess and compare expression levels of A-type lamins. Actin was used as a loading control. With an antibody recognizing the C-terminal globular domain of A-type lamins (Jol-2; Figure 8G, top) lamins A and C were positively identified, next to a third band beneath lamin C representing a 46kDa proteolytic fragment of lamins A/C (Burke, et al., 1983) (Figure 8G, asterisk). No significant differences in expression levels between the normal and mutant lamins were observed. Also, the lamin A/C ratio seemed to be largely unaltered. These findings were confirmed using a lamin A/C antibody recognizing the N-terminal region of A-type lamins (X67; Figure 8G, bottom).

DISCUSSION

We report a novel heterozygous missense mutation c.1315C>T (p.R439C) in the *LMNA* gene that causes a Dunnigan-type familial partial lipodystrophy (FPLD) associated with skeletal and muscular abnormalities not previously reported. Mother and daughter both showed a phenotype that is reminiscent of mandibuloacral dysplasia (MADA; MIM# 248370), as dental crowding, bone resorption of the clavicles, vertical skull base and irregularities resulting from Wormian bones were encountered. However, their tall masculine build with pronounced thigh and upper arm musculature, the absence of the typical pinched nose, the absence of pronounced acro-osteolysis, the specific fat distribution and the absence of hypogonadism all favour a diagnosis of FPLD. In addition, they exhibited normal muscle strength and no signs of muscle wasting as reported in other muscular dystrophy-associated laminopathies, but instead showed a lowered exercise capacity and complained of muscle aching after short periods of mild exercise.

Because of the unique clinical features in our patients, we examined whether the novel mutation exerted unique effects on lamin structure and function as compared to previously reported FPLD-associated *LMNA* mutations. The R439C mutation does not significantly modify the three-dimensional structure nor the thermal stability of the A-type lamin C-terminal globular domain, as was found for other FPLD mutations (Krimm, et al., 2002). However, it provokes oligomerisation of the globular domain *in vitro*. The wild-type Ig-like domain contains only one cysteine residue at position 522, thought to be required for dimerization between two oppositely directed C-terminal Ig-like domains (Stierle, et al., 2003). The mutated Ig-like domain, now containing two cysteines, formed large oligomers *in vitro* through disulfide bond formation, implicating the native residue C522 of the wild-type Ig-like peptide and both residues C522 and C439 of the R439C mutant. Reducing conditions abolished the oligomer formation. In this perspective, we assessed the ability of full-length wild-type and mutant A-type lamins to form disulfide bonds by nuclear matrix isolations from patient and human control fibroblasts. High molecular weight complexes of A-type lamins were extracted from the patient cells under non-reducing conditions, but not or to a much lesser degree from human control fibroblasts. From this we may conclude that the ability of the R439C mutant lamin A/C to form high molecular weight complexes is significantly larger compared to that of the wild-type lamin A/C. These high molecular weight complexes are based on disulfide bonds and could be detected with both the Jol-2 and X67 antibody. The existence of disulfide bond-mediated lamin oligomers in the reducing environment of the living cell can be questioned. Nonetheless, there are transcription factors of which the activity is controlled by the formation of disulfide bonds (Toledano, et al., 2004). Because a previous report by Stierle et al. (2003) shows that a covalent dimer of the A-type lamin C-terminal globular domain (residues 411-553) can bind a 30-40bp DNA fragment, we assessed the DNA binding properties of the R439C mutant disulfide-mediated oligomers of the C-terminal globular domain. Our DNA-binding studies show that the R439C mutation perturbs the interaction with DNA because the gel retardation assay showed a smear of lamin/DNA complexes instead of discrete bands, as seen with wild-type lamin A. We suggest that the smear reflects the presence of unstable DNA-protein interactions due to the formation of multiple oligomers with different affinities for DNA. When increasing amounts of the mutant R439C A-type lamin C-terminal Ig-fold are incubated with a 357bp DNA fragment, protein-protein interactions between high molecular weight oligomers seem to be enhanced, impeding the electrophoretic mobility and resolution of the complexes. Residue R439 is not situated in the regions thought to be involved in the interaction between the Ig-like domain and DNA, i.e. the region holding the nuclear localization signal and a large positively charged region centered around residue R482 (Stierle, et al., 2003). Thus, the mutation probably does not interfere directly with the lamin/DNA interaction as has been shown for R482Q (Stierle, et al., 2003). A gel retardation assay with the mutant R482Q showed a decrease in affinity between the peptide and DNA, but distinct bands were still observed. In the case of the R439C mutant therefore, perturbation of DNA binding most probably arises from the formation of oligomers before and during migration. In order to

assess the *in vivo* impact of these findings, we studied the dynamics of R439C mutant lamin A by the FLIP assay. Largely, the effects measured for EGFP-R439C lamin A were comparable to those of the GFP-R482W lamin A mutant (Broers, et al., 2005). However, in case of the R439C lamin A mutant, the amount of fluorescence lost was far more pronounced in the nucleoplasmic region and the lamina, as compared to that of the wild-type lamin A and the R482W mutant. The R482W mutant was previously shown to affect the nucleoplasmic lamin network to a larger extent than the R453W mutant involved in EDMD (MIM# 181350) (Broers, et al., 2005). We think that this difference in stability of the intra-nuclear lamin network results from the putative role of the R482 residue in DNA interaction. In that perspective, the significant destabilisation of the nucleoplasmic lamin network likely reflects the extent to which the R439C mutation affects proper polymerisation into a mature lamin network as well as its altered interaction with DNA. The FRAP assay supported the effect of the R439C mutation on polymerisation and revealed an enhanced fluorescence recovery of the mutant as compared to the wild-type. Considering the impact of the R439C mutation on A-type lamin polymerisation, we expected to find micro-structural nuclear envelope defects. Indeed, immunohistochemical analysis of the patient's fibroblasts revealed nuclear abnormalities that were reported in other FPLD patients, such as blebbing and honeycomb structures (Vigouroux, et al., 2001).

In conclusion, we characterise a novel heterozygous missense mutation p.R439C that introduces a second cysteine residue in the C-terminal globular domain of lamins A and C. The mutation results in a hybrid laminopathy comprising Dunnigan-type lipodystrophy, muscle weakness and skeletal defects reminiscent of progeroid laminopathies. Structural studies performed on the recombinant R439C C-terminal globular domain showed little effect of the mutation on its structure and stability. However, the introduction of a cysteine into the solvent-exposed surface of the Ig-fold results in extensive disulfide-mediated oligomerisation of A-type lamins, as concluded from *in vitro* experiments on recombinant peptide and from nuclear extracts of patient fibroblasts. This oligomerisation affects the interaction with DNA *in vitro*. Photobleaching studies on R439C lamin A supported the *in vivo* impact as the stability of the nuclear lamin networks was adversely affected. Hence, our findings suggest a novel pathogenetic mechanism in laminopathies, based on disulfide-mediated oligomerisation. Future studies will have to determine how such oligomerisation contributes to the pathogenesis of this and potentially other laminopathies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by a research grant of the University Hospital Maastricht to VV. MvS is supported by Barrier Therapeutics. The authors wish to thank Dr Carin G. Faber for neurological examination of our patients, Dr Jean-Claude Courvalin (INSERM, Institut Jacques Monod, Paris) for kindly providing the antibody to lamin B1, Dr. E.B. Lane (Dundee, U.K.) for kindly providing the antibody to lamin B2, Dr. Chris Hutchinson (Durham University, Durham, U.K.) for kindly providing antibody Jol-2, Dr. Georg Krohne (University of Wuerzburg, Germany) for kindly providing antibody X67 and Dr. Michael S. Sinensky (East Tennessee State University, U.S.A.) for kindly providing antibody α -PA to prelamin A. The Netherlands Organization for Scientific Research (NWO, project 901-28-134) is acknowledged for financial support for microscopic equipment and imaging software.

REFERENCES

- Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, Toniolo D. 1994. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 8(4):323-327.
- Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA and others. 1999. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 21(3):285-288.
- Bridger JM, Kill IR, O'Farrell M, Hutchison CJ. 1993. Internal lamin structures within G1 nuclei of human dermal fibroblasts. *J. Cell Sci.* 104 (Pt 2):297-306.
- Broers JL, Bronnenberg NM, Kuipers HJ, Schutte B, Hutchison CJ, Ramaekers FC. 2002. Partial cleavage of A-type lamins concurs with their total disintegration from the nuclear lamina during apoptosis. *Eur. J. Cell Biol.* 81(12):677-691.
- Broers JL, Peeters EA, Kuipers HJ, Endert J, Bouten CV, Oomens CW, Baaijens FP, Ramaekers FC. 2004. Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleocytoplasmic integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum. Mol. Genet.* 13(21):2567-2580.
- Broers JLV, Kuipers HJ, Ostlund C, Worman HJ, Endert J, Ramaekers FCS. 2005. Both lamin A and lamin C mutations cause lamina instability as well as loss of internal nuclear lamin organization. *Exp. Cell Res.* 304(2):582-592.
- Broers JLV, Machiels BM, van Eys GJ, Kuipers HJ, Manders EM, van Driel R, Ramaekers FCS. 1999. Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 20):3463-3475.
- Burke B, Stewart CL. 2002. Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3(8):575-585.
- Burke B, Tooze J, Warren G. 1983. A monoclonal antibody which recognises each of the nuclear lamin polypeptides in mammalian cells. *Embo J.* 2(3):361-367.
- Cao H, Hegele RA. 2000. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 9(1):109-112.
- Chaudhary N, Courvalin JC. 1993. Stepwise reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *J. Cell Biol.* 122(2):295-306.
- Dessev GN, Iovcheva-Dessev C, Goldman RD. 1990. Lamin dimers. Presence in the nuclear lamina of surf clam oocytes and release during nuclear envelope breakdown. *J. Biol. Chem.* 265(21):12636-12641.
- Duband-Goulet I, Courvalin JC. 2000. Inner nuclear membrane protein LBR preferentially interacts with DNA secondary structures and nucleosomal linker. *Biochemistry* 39(21):6483-6488.
- Dyer JA, Kill IR, Pugh G, Quinlan RA, Lane EB, Hutchison CJ. 1997. Cell cycle changes in A-type lamin associations detected in human dermal fibroblasts using monoclonal antibodies. *Chromosome Res.* 5(6):383-394.
- Edidin M, Zuniga MC, Sheetz MP. 1994. Truncation mutants define and locate cytoplasmic barriers to lateral mobility of membrane glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91(8):3378-3382.
- Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, Atherton J, Vidaillet HJ, Jr., Spudich S, De Girolami U and others. 1999. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N. Engl. J. Med.* 341(23):1715-1724.
- Garg A, Vinatierthan M, Weatherall PT, Bowcock AM. 2001. Phenotypic heterogeneity in patients with familial partial lipodystrophy (dunnigan variety) related to the site of missense mutations in lamin a/c gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(1):59-65.
- Goldman RD, Gruenbaum Y, Moir RD, Shumaker DK, Spann TP. 2002. Nuclear lamins: building

- blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* 16(5):533-547.
- Haque WA, Oral EA, Dietz K, Bowcock AM, Agarwal AK, Garg A. 2003. Risk factors for diabetes in familial partial lipodystrophy, Dunnigan variety. *Diabetes Care* 26(5):1350-1355.
- Hegele RA, Anderson CM, Wang J, Jones DC, Cao H. 2000. Association between nuclear lamin A/C R482Q mutation and partial lipodystrophy with hyperinsulinemia, dyslipidemia, hypertension, and diabetes. *Genome Res.* 10(5):652-658.
- Hozak P, Sasseville AM, Raymond Y, Cook PR. 1995. Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *J. Cell Sci.* 108:635-644.
- Hutchison CJ. 2002. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3(11):848-858.
- Hutchison CJ, Alvarez-Reyes M, Vaughan OA. 2001. Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J. Cell Sci.* 114(Pt 1):9-19.
- Krimm I, Ostlund C, Gilquin B, Couprie J, Hossenlopp P, Mornon JP, Bonne G, Courvalin JC, Worman HJ, Zinn-Justin S. 2002. The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure* 10(6):811-823.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Machiels BM, Broers JL, Raymond Y, de Ley L, Kuipers HJ, Caberg NE, Ramaekers FC. 1995. Abnormal A-type lamin organization in a human lung carcinoma cell line. *Eur. J. Cell Biol.* 67(4):328-335.
- Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, de Visser M, Schwartz K. 2000. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum. Mol. Genet.* 9(9):1453-1459.
- Nigro V, Bruni P, Ciccodicola A, Politano L, Nigro G, Piluso G, Cappa V, Covone AE, Romeo G, D'Urso M. 1995. SSCP detection of novel mutations in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy: definition of a small C-terminal region required for emerin function. *Hum. Mol. Genet.* 4(10):2003-2004.
- Novelli G, Muchir A, Sanguolo F, Helbling-Leclerc A, D'Apice MR, Massart C, Capon F, Sbraccia P, Federici M, Lauro R and others. 2002. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am. J. Hum. Genet.* 71(2):426-431.
- Plasilova M, Chattopadhyay C, Pal P, Schaub NA, Buechner SA, Mueller H, Miny P, Ghosh A, Heinemann K. 2004. Homozygous missense mutation in the lamin A/C gene causes autosomal recessive Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *J. Med. Genet.* 41(8):609-614.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Plainview, NY.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shelton KR, Guthrie VH, Cochran DL. 1982. Oligomeric structure of the major nuclear envelope protein lamin B. *J. Biol. Chem.* 257(8):4328-4332.
- Shepp LA, Vardi Y. 1982. Maximum likelihood reconstruction for emission tomography. *IEEE Trans. Med. Imag.* MI-1:113-121.
- Sinensky M, Fantle K, Dalton M. 1994. An antibody which specifically recognizes prelamin A but not mature lamin A: application to detection of blocks in farnesylation-dependent protein processing. *Cancer Res.* 54(12):3229-3232.
- Stierle V, Couprie J, Ostlund C, Krimm I, Zinn-Justin S, Hossenlopp P, Worman HJ, Courvalin JC, Duband-Goulet I. 2003. The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry* 42(17):4819-4828.
- Toledano MB, Delaunay A, Monceau L, Tacnet F. 2004. Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem. Sci.* 29(7):351-357.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide

- gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 76(9):4350-4354.
- Venables RS, McLean S, Luny D, Moteleb E, Morley S, Quinlan RA, Lane EB, Hutchison CJ. 2001. Expression of individual lamins in basal cell carcinomas of the skin. *Br. J. Cancer* 84(4):512-519.
- Vigouroux C, Auclair M, Dubosclard E, Pouchelet M, Capeau J, Courvalin JC, Buendia B. 2001. Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J. Cell Sci.* 114(Pt 24):4459-4468.

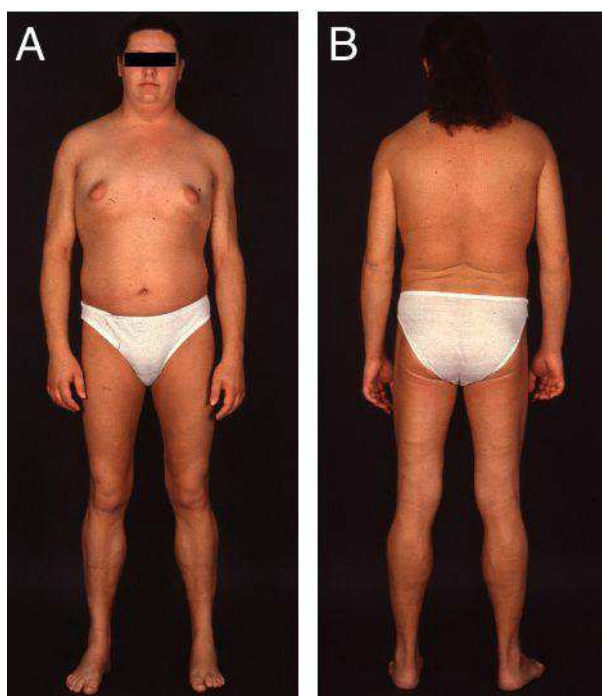


Figure 1. Clinical characteristics of the 25-year-old daughter.

A) Masculine build, limited breast development, lack of adipose tissue in the extremities and excess of fat deposition in the face, neck and labia majora.

B) Masculine build and pronounced calf musculature.

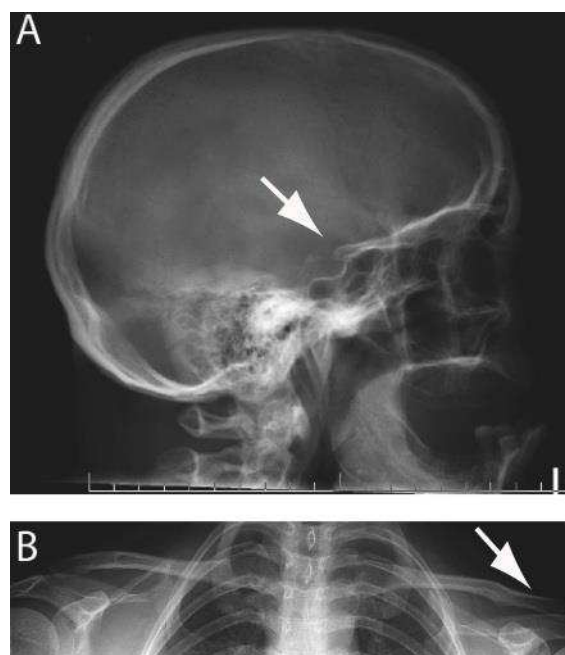


Figure 2. Radiography of the skull and clavicles.

A) Radiography of the mother's skull with vertical skull base (arrow) and Wormian bone remnants visible in the occipital region.

B) Radiography of the daughter's clavicles with resorption of the distal end of the left clavicle (arrow).

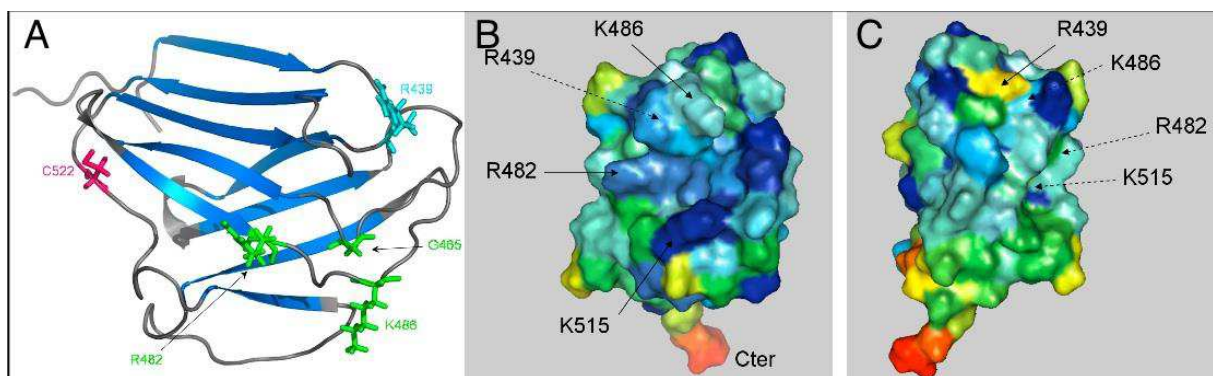


Figure 3. Structure of the R439C mutant A-type lamin C-terminal globular domain.

A) Backbone structure of the Ig-globular domain of LA/C (residues 411-553), as determined by NMR. The affected residue R439 is located in a loop connecting β 1- and β 2-strands. On the opposite side of the β -sandwich residue C522 is found, the only cysteine present in the native C-terminal globular domain of A-type lamins.

B, C) Three-dimensional representation of the C-terminal Ig-like fold of A-type lamins. The color code indicates the degree of conservation in a spectrum from dark blue for highly conserved residues to red for less conserved residues. The affected residue R439 is not conserved between A- and B-type lamins, though strongly conserved between A-type lamins (depicted in yellow). This residue is located at more than 10 Å from a highly conserved positively charged region affected in previously described FPLD. B) Dark blue colored region positively charged and hydrophobic, forming a cave in the Ig-fold. Residue R439 lays behind this surface as demarcated by the dotted arrow. C) The orientation of the C-terminal globular domain corresponds to that of Figure 3B rotated by 90° around the vertical axis, revealing the position of the R439 residue.

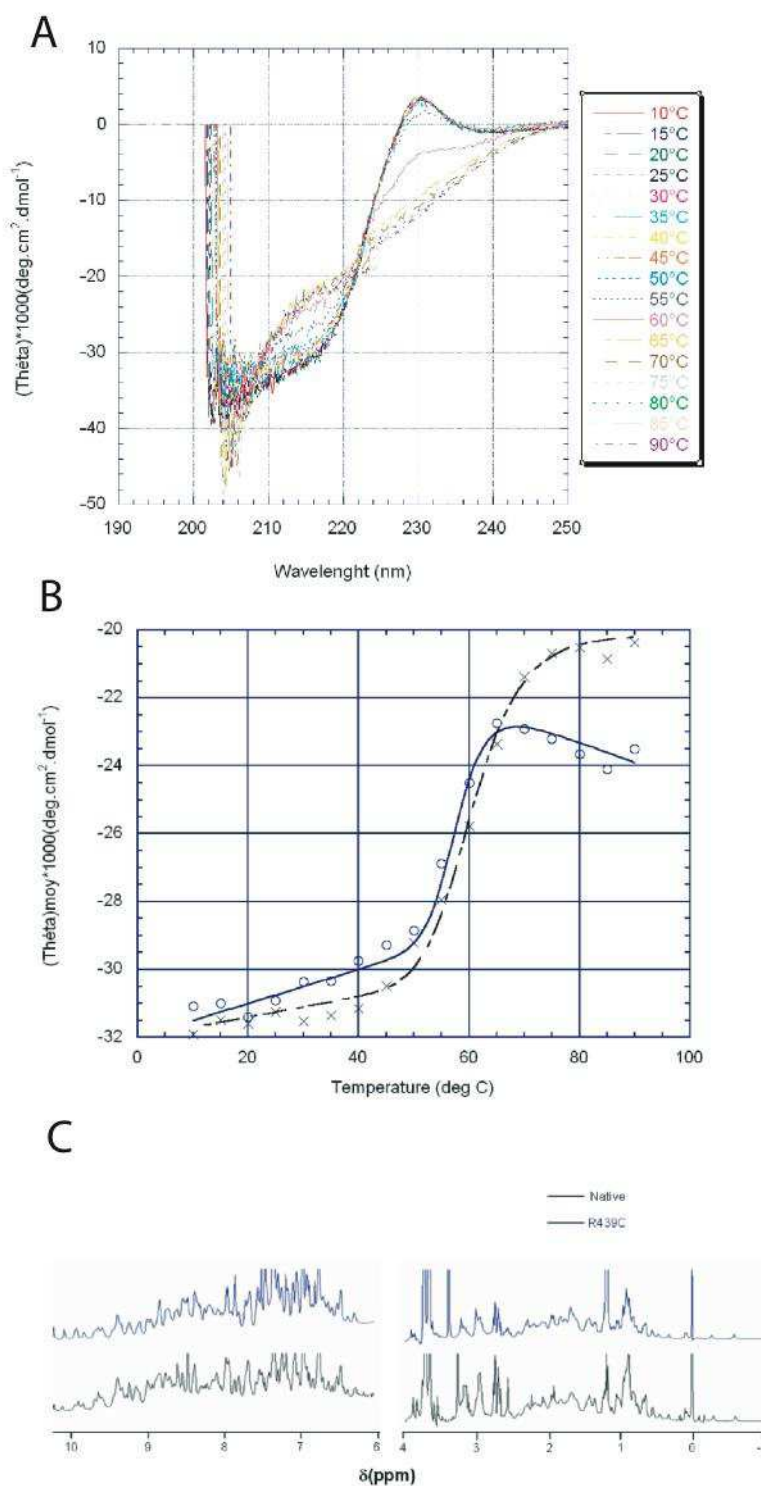


Figure 4. Structural characterisation of the R439C mutant A-type lamin C-terminal globular region (residues 411-553) by circular dichroism (CD) and NMR.

A) Evolution of the CD spectrum of the R439C mutant Ig-like domain of A-type lamins as a function of temperature. Curves corresponding to temperatures from 10° to 90°C are displayed according to the color code at the right of the diagram.

B) Molar residual ellipticity as a function of the temperature for the wild-type and R439C mutant lamin globular domain was measured between 212 nm and 218 nm; the average measurement is shown. The figure shows that the denaturation temperature of the R439C mutant is 58°C (blue graph). This value is close to the denaturation temperature of the wild-type domain (about 62°C) (black graph).

C) Proton 1D NMR spectra of the wild-type domain (black plot) and the R439C mutant lamin globular domain (blue plot) recorded at 20°C. Analysis of the NMR proton spectra shows that the R439C mutation does not significantly change the 3D structure of the Ig-like domain.

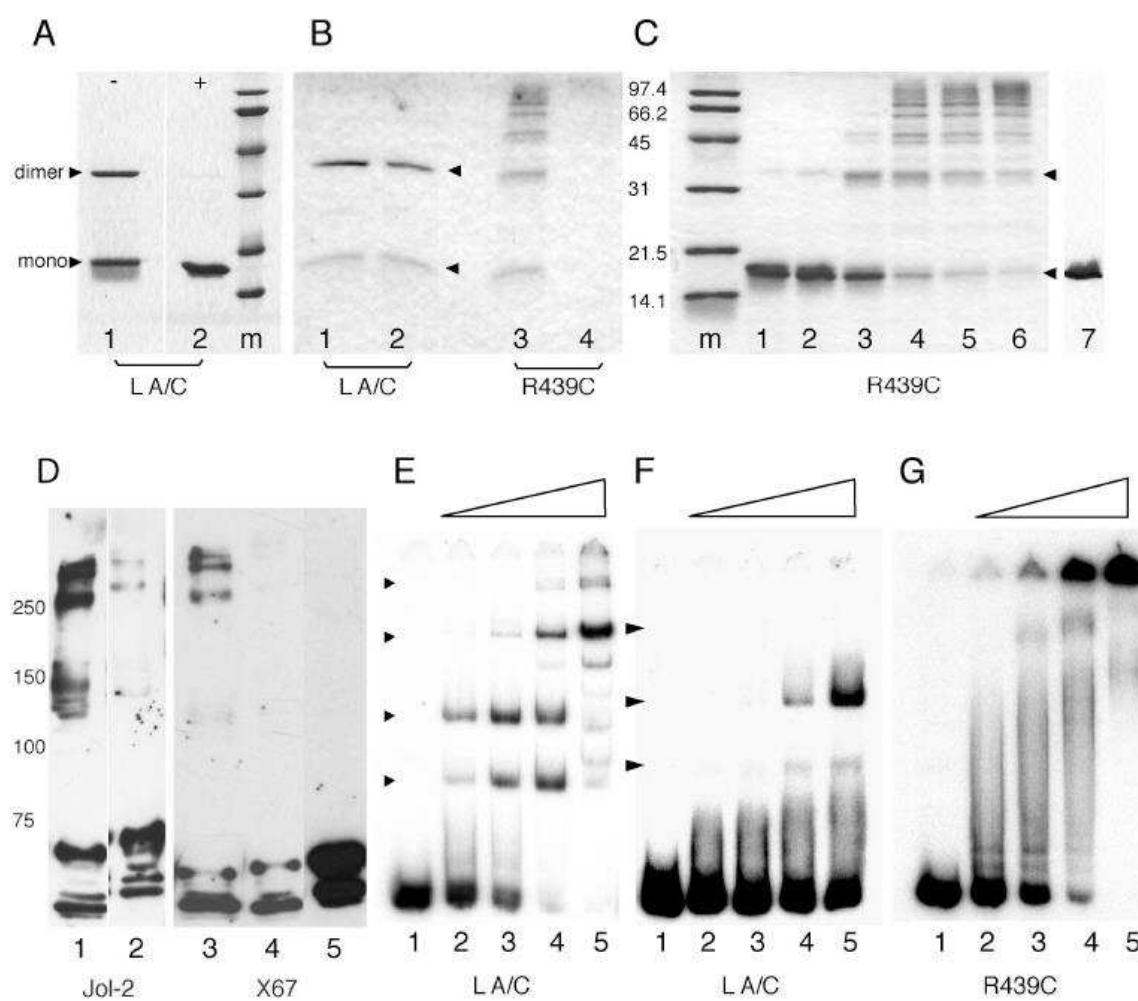


Figure 5. Oligomerisation of A-type lamins and DNA interaction.

A) SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of the wild-type lamin A/C Ig-fold domain (residues 411-553). Coomassie Brilliant Blue staining of gels in which the wild-type peptide was resolved under non-reducing conditions (lane 1) and reducing conditions (lane 2) after incubation at 4°C for 16h. Under reducing conditions a single band occurs corresponding to the monomer (~18 kDa) whereas under non-reducing conditions dimerisation of the Ig-fold is observed (~36 kDa).

B) SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of dimerization of the wild-type lamin A/C (referred to as LA/C) and oligomerisation of the R439C lamin A/C mutant (referred to as R439C) Ig-fold domains (residues 411-553). Coomassie Brilliant Blue staining of the gel in which LA/C and R439C peptides were resolved under non-reducing conditions. Lanes 1 and 3 correspond to an incubation at 4°C for 40h of LA/C and R439C peptides, respectively. Lanes 2 and 4 correspond to an incubation at 37°C for 16h of LA/C and R439C peptides, respectively. Dimerization of the wild-type LA/C and an oligomerisation of the R439C mutant are clearly observed. At 37°C the mutant R439C peptide oligomerises to large complexes that impede their electrophoretic resolution (lane 4).

C) SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of the time dependent oligomerisation at 4°C of the R439C lamin A/C mutant Ig-fold domain (residues 411-553). Coomassie Brilliant Blue staining of the gel in which the R439C mutant was resolved under non-reducing conditions. Lane 1 indicates the mobility of the monomer R439C. Note that a slight oligomerisation is present in the starting material. Lanes 2 to 6 reveal the peptide oligomers formed after 16h, 24h, 40h, 48h and 62h of incubation at 4°C, respectively. The lowest arrowhead refers to the monomer, the highest refers to the dimer. Lane 7 represents a Coomassie Brilliant Blue staining of a gel in which the R439C mutant was resolved under reducing conditions. Under these conditions oligomerisation does not take place.

D) Oligomerisation of the R439C mutant A-type lamins under non-reducing conditions. Nuclear matrix fractions obtained from patient fibroblasts (R439C; lanes 1, 3 and 5) and a human control fibroblast cell line (NHDF; lanes 2, 4) were analysed on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis with (lane 5) or without (lanes 1-4) β -mercaptoethanol. Staining with the Jol-2 antibody (lanes 1, 2) and the X67 antibody (lanes 3-5) revealed immunoreactive high molecular weight complexes under non-reducing conditions in the patient sample and to a significantly lower extent in the control sample. In the presence of β -mercaptoethanol these high molecular weight complexes could not be detected (lane 5).

E) Binding of the wild-type LA/C (residues 411-553) dimer to DNA. The 357 bp DNA fragment at a concentration of 11nM in 100mM NaCl was incubated for 3h at room temperature with increasing concentrations of the wild-type lamin A/C Ig-fold (LA/C) previously dimerised at 37°C for 2h30. Incubation was performed in the presence of an 8-fold (lane 2), 16-fold (lane 3), 32-fold (lane 4) and 64-fold (lane 5) molar excess of the peptide. Lane 1 indicates the mobility of naked DNA.

F, G) The 357 bp DNA fragment at a concentration of 11nM in 100mM NaCl was incubated for 3h at 4°C with increasing concentrations of the wild-type LA/C (Figure 5F) and R439C mutant (Figure 5G) Ig-peptide (residues 411-553) previously dimerised or oligomerised respectively, at 4°C for 24h. Incubations were performed in the presence of an 8-fold (lane 2), 16-fold (lane 3), 32-fold (lane 4) and 64-fold (lane 5) molar excess of the peptides. Lanes 1 indicate the mobility of naked DNA. Stable DNA/peptide complexes are formed with the highest concentrations of the wild-type LA/C dimerised at 4°C (arrowhead, Figure 5F). The R439C mutant oligomers bind to DNA (Figure 5G). However, the DNA/peptide complexes migrate as a smear on the gel (Figure 5G, lanes 2 to 4) revealing a lower stability of the DNA/peptide interactions. At higher peptide concentrations, DNA/peptide complexes failed to enter the gel (Figure 5G, lanes 4 and 5) due to enhanced protein-protein interactions.

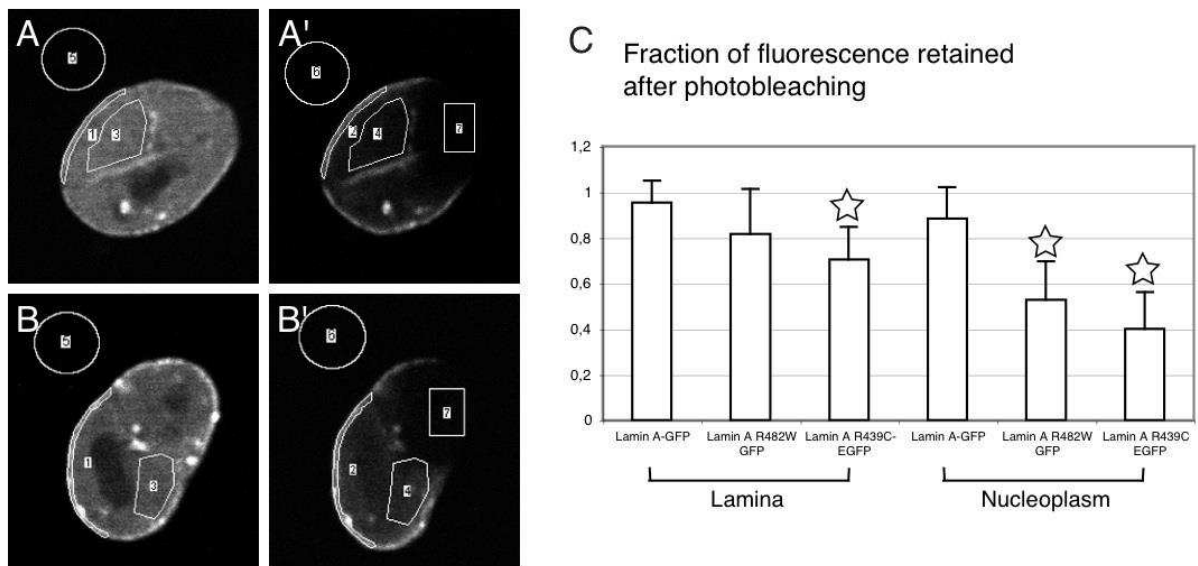


Figure 6. Fluorescence loss of intensity (FLIP) studies in CHO-K1 cells transfected with the pEGFP-Lamin A R439C construct.

A and A'/ B and B') Examples of different areas measured in the cells before (A and B; 1 = lamina, 3 = nucleoplasm, 5 = background) and after (A' and B'; 2 = lamina, 4 = nucleoplasm, 6 = background, 7 = bleached area) photobleaching.

C) Summary of FLIP measurements. Mean values of retained fluorescence in the lamina and nucleoplasm are given with standard errors. Statistical analyses were performed using Student's t test, comparing the R439C lamin A mutant with wild-type lamin A and the R482W lamin A mutant. Asterisks indicate the levels of significance, i.e. R439C lamin A mutant in lamina ($P < 3 \times 10^{-5}$), R439C lamin A mutant in nucleoplasm ($P < 2 \times 10^{-8}$), and R482W lamin A mutant in nucleoplasm ($P < 0.05$).

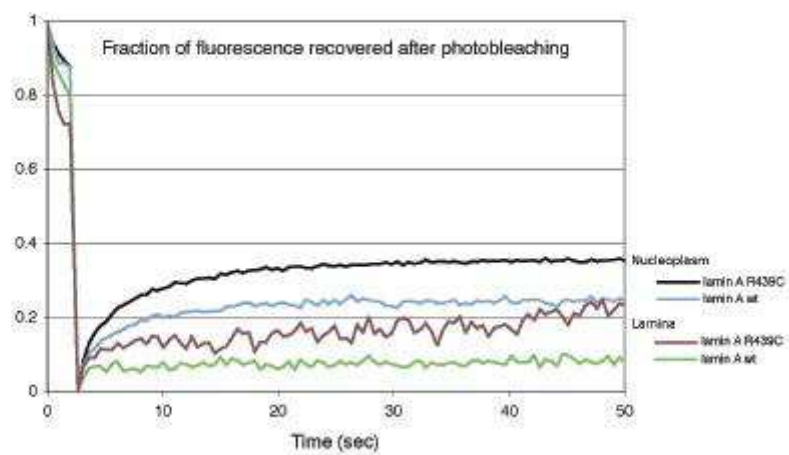


Figure 7. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) in CHO-K1 cells transfected with the pEGFP-lamin A R439C and the wild-type pEGFP-lamin A construct. A higher rate of fluorescence recovery was found in the nucleoplasm for the mutant lamin A protein as compared to the wild-type. Interestingly, the fraction of EGFP fluorescence recovered in the lamina was evidently higher for the R439C mutant than for the wild-type lamin A protein. These findings indicate an increased mobility of the R439C mutant lamin A protein.

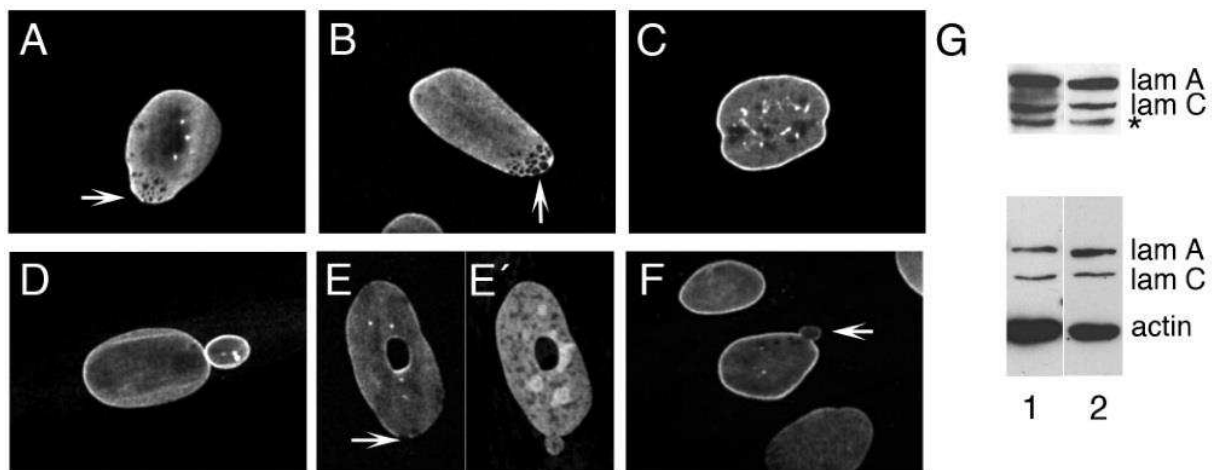


Figure 8. Immunofluorescence labelling of A-and B-type lamins in single confocal sections (panels A-F) and immunoblotting of cultured patient fibroblasts (panel G). All nuclei were counterstained with propidium iodide (E').

Lamin A/C staining with antibody Jol-2 (A) and lamin A staining with antibody 133A2 (B) reveals the presence of honeycomb figures in the nuclear lattice (arrow). Lamin C staining with antibody RalC (C) reveals intra-nuclear tubular structures. Emerin staining with antibody NCL-Emerin (D) shows an increased expression of emerlin within the bleb. Intra-nuclear structures are visible in the bleb. Staining with antibody 119D5-F1 (E) reveals the absence of lamin B1 in the lamina lining the protrusion filled with chromatin (arrow). Note the donut-shaped nucleus. Staining with antibody LN43 (F) shows presence of lamin B2 in intra-nuclear foci and a reduced expression in the lamina lining the bleb (arrow). Scale bars represent 10µm.

Immunoblotting for lamins A and C (G) in human control fibroblasts (NHDFa, lane 1) and patient fibroblasts (lane 2). Actin was used as a control for protein loading. With the Jol-2 antibody (top) and the X67 antibody (bottom) bands corresponding to lamins A and C could be detected. Underneath the band corresponding to lamin C, an additional band corresponding to the 46kDa proteolytic fragment containing the C-terminal end of lamins A/C was found (asterisk).

2. En cours : à la recherche des ponts disulfures de la lamine in vivo

Suite à l'observation de l'oligomérisation du mutant R439C du domaine globulaire des lamines de type A *in vitro*, j'ai voulu savoir si cette oligomérisation se produisait *in vivo*. Pour cela, j'ai réalisé des expériences à partir de cellules HeLa ou de fibroblastes de malades avec la mutation R439C sur les lamines de type A chez Michel B. Toledano du SBGM au CEA de Saclay. A l'aide de NEM, j'ai bloqué la formation de ponts disulfures supplémentaires dans ces cellules (figure 60). J'ai ensuite extrait les lamines et observé l'oligomérisation des lamines de type A en présence ou non de réducteur (figure 61). La présence de réducteur doit rompre tous les ponts disulfures. Par conséquent, toutes les bandes observées en présence de réducteur correspondent soit aux lamines de type A, soit à des complexes formés avec les lamines de type A et qui ne sont pas dus aux cystéines.

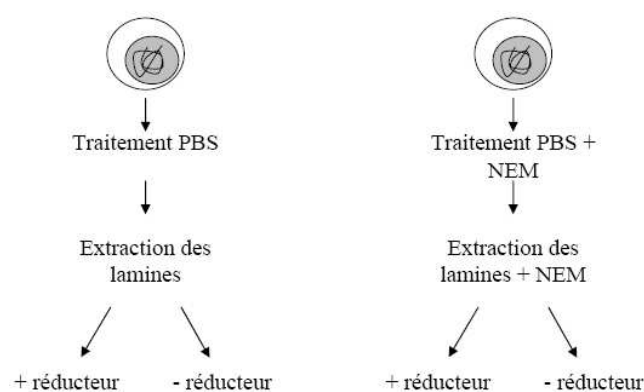


Figure 60 : Description de l'expérience de blocage des ponts disulfures par NEM

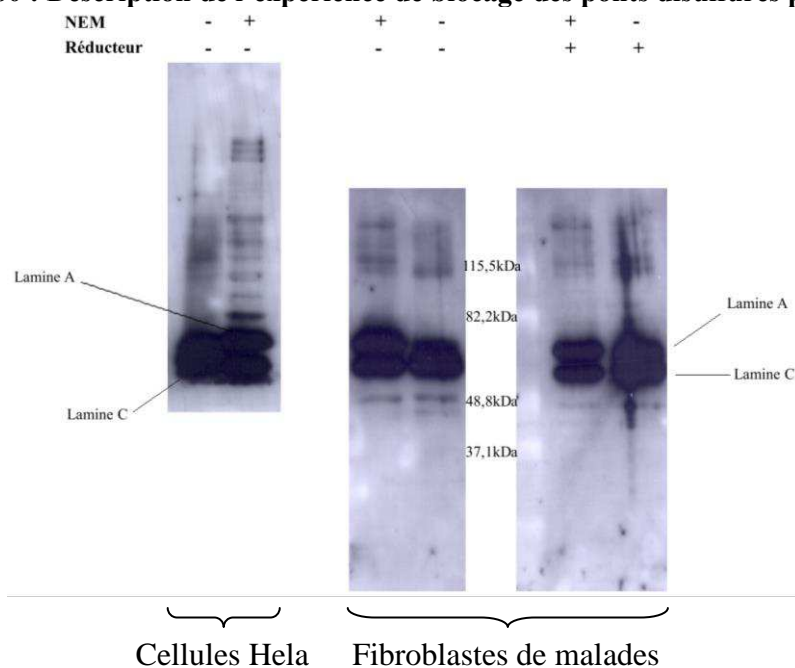


Figure 61 : Blot des expériences réalisées sur des lamines extraites à partir de cellules HeLa ou de fibroblastes de malades avec la mutation R439C sur les lamines de type A. Révélation avec un anticorps anti-lamine A donné par B. Buendia.

Ces expériences ont permis d'observer la formation d'un pont disulfure intramoléculaire dans les lamines A mais pas dans les lamines C. Ce pont n'existe pas *in vivo* car il disparaît en présence de NEM. En revanche, nous n'avons pas observé la formation de pont disulfure intermoléculaire. Ces résultats préliminaires ont précédé d'autres expériences en cours de réalisation chez nos collaborateurs à Maastricht. Ceux-ci ont travaillé sur des fibroblastes de malades avec la mutation R439C mais cette fois-ci avec des fibroblastes normaux comme témoin puis ont révélé les protéines d'intérêt avec différents anticorps anti-lamine A.

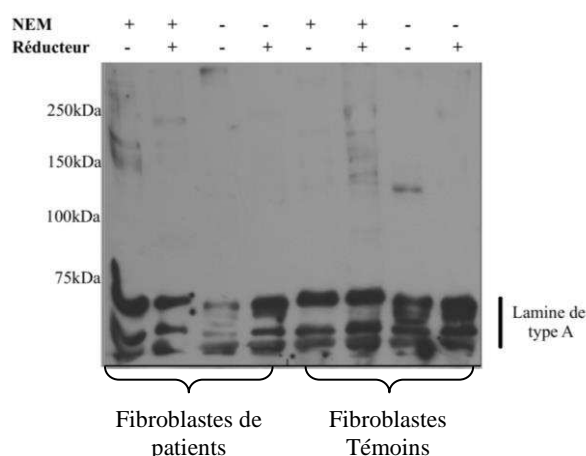


Figure 62 : Blot des expériences réalisées sur des lamines extraites à partir de fibroblastes sains ou de fibroblastes de malades avec la mutation R439C sur les lamines de type A. Révélation des lamines de type A par un anticorps anti-lamine A.

Le blot de la figure 62 montre plusieurs bandes correspondant au poids moléculaire des lamines A/C monomères. En effet, l'anticorps anti-lamine A permet la révélation de la présence des différentes lamines de type A : lamine A, lamine C, lamine A Δ 10 et des formes mineures. L'oligomérisation observée sur les pistes 3 et 7 nous permet de confirmer les résultats obtenus *in vitro* sur le domaine globulaire des lamines A/C en conditions non réductrices. La comparaison des pistes 1 et 5 pourrait indiquer une faible oligomérisation du mutant des lamines de type A *in vivo* mais ce résultat n'a pour l'instant pas été reproduit.

En conclusion, nous ne pouvons pas encore affirmer que les lamines de type A peuvent oligomériser *in vivo*. Dans la littérature, la recherche d'oligomères des lamines avait été réalisé sur des lamines de différents organismes mais dans des conditions où les lamines pouvaient s'oxyder *in vitro* (Dessev et al., 1990; Shelton et al., 1982). Par conséquent, nos résultats apportent un début de preuve de l'oligomérisation de certaines lamines humaines *in vivo*.

Chapitre 4 : Conclusions et perspectives

Aujourd'hui le rôle de l'enveloppe nucléaire apparaît être non seulement mécanique - l'enveloppe soutient la membrane nucléaire interne - mais aussi génétique - l'enveloppe régule l'expression de certains gènes et influence en particulier les processus de prolifération et de différenciation cellulaire. Récemment, la lamina nucléaire a été proposée comme impliquée dans les processus de vieillissement normaux et pathologiques. Certaines protéines de l'enveloppe impliquées dans ces mécanismes ont été identifiées, et au cours de ma thèse différents partenaires biologiques ont été proposés pour ces protéines. Cependant, aucune donnée structurale n'existe qui permettrait d'élucider à l'échelle atomique les mécanismes moléculaires sur lesquels reposent les principales fonctions de l'enveloppe nucléaire.

I. MAN1, protéine régulatrice ou inhibitrice de la transcription

Au cours de ma thèse, l'un des objectifs de mon travail était d'apporter des informations structurales et fonctionnelles qui permettent de comprendre le rôle de la protéine MAN1, notamment de sa région C-terminale. En effet, notre collaborateur H.J. Worman avait identifié une interaction entre cette région de MAN1 et le domaine MH2 des protéines Smad2 et Smad3, protéines régulatrices de la transcription. Cela nous a conduits à nous demander comment une protéine de l'enveloppe nucléaire pouvait intervenir au niveau de la régulation transcriptionnelle des gènes cibles des ligands de la famille de TGF- β ? Pour essayer de répondre à cette question, j'ai commencé par caractériser la région C-terminale de MAN1 par RMN. Cela m'a permis d'apporter des informations structurales sur les deux domaines qui composent cette région : un premier domaine pour lequel on ne connaissait aucune information structurale (MAN1C^A) et un deuxième domaine pour lequel un repliement de type UHM était prédit (MAN1C^B). Ce dernier domaine s'est révélé adopter une structure fluctuante et j'ai suggéré que la présence de l'un de ses partenaires biologiques pourrait le stabiliser, comme cela a été montré pour un autre domaine de type UHM (Kellenberger et al., 2002).

J'ai résolu par RMN la structure tridimensionnelle du premier domaine C-terminal de MAN1. C'est un repliement de type Winged-Helix (WH). Les motifs WH sont des domaines de liaison à l'ADN donc j'ai testé si cette hypothèse était valable pour MAN1. J'ai mis en évidence une interaction entre MAN1C^A et l'ADN tout à fait classique, c'est-à-dire impliquant l'hélice H3 du WH. Enfin, à partir de l'analyse des structures tridimensionnelles de complexes WH/ADN résolus par cristallographie, j'ai proposé un modèle de complexe

entre MAN1C^A et l'ADN. Dans ce modèle, on observe que la région de MAN1C^A impliquée dans l'interaction avec les R-Smads n'est pas enfouie lors de l'interaction avec l'ADN. J'ai donc proposé la possibilité de l'existence d'un complexe ternaire entre l'ADN, MAN1 et les R-Smads. Dans cette optique, MAN1 n'aurait pas le rôle d'inhibiteur de la transcription proposé dans la littérature. En effet, dans toutes les expériences réalisées sur l'impact de MAN1 dans la voie de signalisation de TGF- β , MAN1 est surexprimée, capture de manière excessive les R-Smads et bloque certaines voies de signalisation impliquant ces R-Smads. Cependant, la rétention des protéines R-Smads à l'enveloppe nucléaire par MAN1 pourrait avoir comme but de stimuler l'expression d'une autre famille de gènes spécifiques du domaine WH de MAN1 et régulée par les ligands de la famille de TGF- β .

Dans la littérature, une autre protéine comprenant un motif WH intervient dans une voie de la signalisation par TGF- β en interagissant avec les protéines R-Smads : Fast-1 (Chen et al., 1997). Cette protéine, comme MAN1, est localisée dans le noyau, interagit avec les protéines R-Smads par un domaine différent du WH, forme des complexes avec l'ADN et bloque une voie de signalisation par TGF- β quand elle est surexprimée. Sur ce modèle, on peut soumettre un mode d'action de MAN1. Les protéines R-Smads se lient à Smad4 afin d'entrer dans le noyau. Une fois dans le noyau, toutes les protéines Smads reconnaissent par leur domaine MH1 la même séquence d'ADN donc ces protéines ont besoin d'un cofacteur de liaison à l'ADN afin d'acquérir une spécificité de séquence originale. Ce cofacteur peut correspondre à notre motif WH. Ainsi, le trimère Smad4, R-Smad et MAN1 se lie à l'ADN afin de transcrire des gènes spécifiques (figure 63).

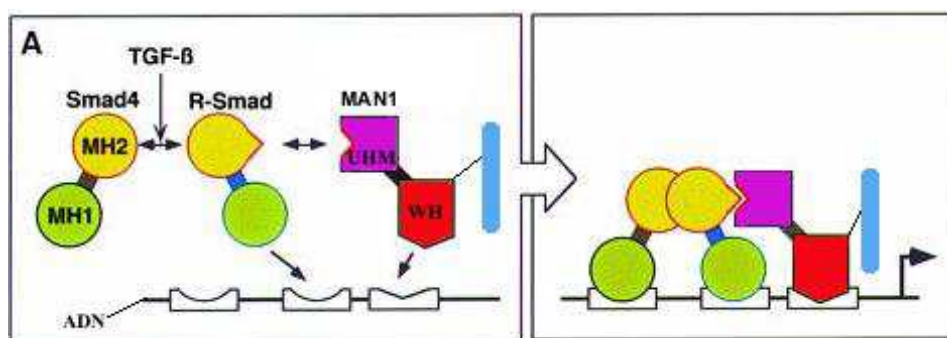


Figure 63 : Représentation d'un modèle pour la reconnaissance et la régulation de gènes spécifiques par les protéines Smads en concert avec MAN1 (Massague and Wotton, 2000).

Pour valider ce modèle, il faudrait maintenant prouver l'existence du complexe ternaire MAN1C^B/MH₂/ADN, identifier la séquence d'ADN spécifiquement reconnue par le motif WH de MAN1, et déterminer la structure du complexe MAN1C^B/MH₂/ADN_{spécifique} par RMN et modélisation ou cristallographie.

Toutes les pathologies causées par des mutations dans le gène de MAN1 touchent les os. En effet, ces mutations entraînent la perte de la région C-terminale de la protéine puis une expression amplifiée des gènes activés par TGF- β et BMP, ce qui provoque des lésions des os. Une fois la séquence d'ADN spécifique du WH de MAN1 déterminée, il faudrait envisager de comprendre comment le complexe MAN1/Smad2/Smad4/ADN contribue à un processus biologique essentiel pour la formation des os.

II. La lamine et ses partenaires

En parallèle, pendant ma thèse, j'ai aussi continué le travail initié au laboratoire sur la caractérisation de la structure tridimensionnelle de régions de la lamine de type A et la cartographie de leurs surfaces d'interactions avec d'autres protéines de l'enveloppe nucléaire ou des facteurs de transcription. La structure tridimensionnelle du domaine riche en acides aminés hydrophobes 411-553 de la partie « queue » des lamines de type A avait été déterminée par RMN. Cependant, les interactions décrites dans la littérature entre cette partie « queue » et plusieurs partenaires biologiques de la lamine impliquent non seulement le domaine de structure tridimensionnelle connue 411-553, mais aussi le fragment se trouvant en C-terminal de ce domaine : 554-646.

J'ai donc commencé par caractériser l'ensemble de la région 411-646, par RMN. J'ai montré que la structure de la partie globulaire et structurée 411-553 reste inchangée dans le fragment 411-646. De plus, dans le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de la lamine 411-646, les pics représentant les résidus de 554-646 ont des déplacements chimiques caractéristiques d'un peptide déstructuré. En conclusion, la partie 554-646 du fragment 411-646 n'interagit pas avec les résidus 411-553 et est déstructurée. Mais ces résidus semblent importants pour la liaison à différents partenaires donc on peut penser qu'ils acquièrent une structure repliée au contact d'un partenaire biologique.

Parallèlement, je me suis focalisée sur deux interactions impliquant la lamine de type A : (1) lamine A-émerine, sur laquelle il existe une importante littérature, notamment car ces deux molécules sont mutées dans des formes cliniquement similaires de la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss. (2) lamine A-SREBP1 comme exemple d'une interaction de la lamina avec un facteur de transcription impliqué dans la différenciation cellulaire.

Dans le premier cas, l'interaction décrite *in vivo* et *in vitro* entre la lamine A et l'émerine n'a pu être retrouvée, ni par GST pulldown, ni par BiaCore, ni par RMN. La majorité des expériences publiées repose sur l'utilisation de l'ensemble de la partie nucléoplasmique de l'émerine 1-222, alors que nous n'avons testé que l'émerine 1-187, sans la partie poly-Ser C-terminale. Deux groupes ont mis en évidence une interaction entre

l'émerine 1-187 et la lamine de type A. L'équipe de C. J. Hutchison a réalisé des expériences de co-immunoprécipitation à partir de lysats de réticulocytes dans lesquels ils ont exprimé l'émerine recombinante 1-187 (Vaughan et al., 2001). L'équipe de G.E. Morris a aussi mis en évidence une interaction entre ce fragment d'émerine et la lamine A mais à partir de culot bactérien repris dans de l'urée (Clements et al., 2000). En conséquence, ces deux groupes ne peuvent n'avoir observé qu'une interaction indirecte entre le fragment d'émerine 1-187 et les lamines de type A.

Aujourd'hui, nous proposons deux hypothèses pour expliquer nos résultats : soit le segment 188-222 est indispensable à l'interaction, soit l'interaction entre les deux protéines est stabilisée par un troisième partenaire ou même est indirecte. Il faut rappeler qu'un argument fort en faveur d'une relation structurale entre la lamine de type A et l'émerine est la localisation de l'émerine dépendante de la lamine (Vaughan et al., 2001).

Notre première hypothèse est contredite par l'équipe de K. Wilson qui a réalisé des expériences de blot overlay avec des mutants d'émerine, et a montré ainsi que la région centrale de l'émerine, des résidus 70 à 178, était impliqué dans l'interaction avec la lamine A entière (Lee et al., 2001). En contrepartie, certains partenaires de l'émerine ont besoin de cette région 188-222 pour interagir avec l'émerine ; c'est notamment le cas de GCL, un facteur de la transcription (Holaska et al., 2003).

La deuxième hypothèse qui implique la présence d'un troisième partenaire dans ce complexe lamine-émerine a été récemment étayée par l'équipe de K. Wilson (Holaska et al., 2003). En effet, d'après des expériences de microtitrage sur billes, la lamine A et BAF peuvent se lier simultanément à l'émerine. Cette même équipe vient de suggérer que la non-phosphorylation de BAF serait à l'origine de l'augmentation de la liaison émerine-lamine A *in vitro* et donc que la phosphorylation de BAF inhiberait cette interaction (Bengtsson and Wilson, 2006). Récemment, l'équipe de I. Karakesisoglou a aussi mis en évidence, par des expériences de GST pulldown, des interactions entre la nesprine 2, la lamine A/C et l'émerine (Libotte et al., 2005). Ces expériences ont montré que la lamine et l'émerine interagissaient directement avec différents domaines de la nesprine 2. En conséquence, la nesprine 2 jouerait le rôle d'intermédiaire entre la lamine et l'émerine.

Les deux hypothèses sont aujourd'hui étudiées au laboratoire. En effet, nous construisons actuellement le plasmide de la région N-terminale nucléoplasmique de l'émerine 1-222. Nous pourrions ainsi comparer en RMN les fragments 1-187 et 1-222. Nous pourrions aussi réaliser les expériences de GST pulldown avec ce fragment 1-222 de l'émerine et les différents fragments de la lamine que nous possédons afin d'observer les différences par rapport au fragment 1-187.

Afin de répondre à la seconde hypothèse du complexe ternaire entre la lamine, l'émerine et la nesprine 2, nous sommes en train d'exprimer les différents fragments de nesprine 2 impliqués dans l'interaction avec la lamine et l'émerine. Nous voudrions vérifier ces interactions par pulldown et par RMN.

J'ai aussi tenté d'apporter des informations structurales sur l'émerine. Comme cela a été dit précédemment, aussi bien la lamine de type A que l'émerine sont mutées dans l'EDMD donc l'objectif du laboratoire était de positionner les mutations pathologiques dans la structure tridimensionnelle de chacune des deux protéines. Le travail a été publié dans le cas de la lamine (Krimm et al., 2002). Pour ce qui est de l'émerine, j'ai enregistré des expériences RMN : ^1H - ^{15}N HSQC et nOes hétéronucléaires ^1H - ^{15}N de la région nucléoplasmique 1-187. Cette région ne présente qu'une partie structurée, son domaine LEM N-terminal et la structure tridimensionnelle de ce domaine a déjà été résolue au laboratoire (Wolff et al., 2001). Le reste de la protéine n'est pas clairement replié. En conséquence, soit ce fragment 1-187 de l'émerine a besoin des résidus 188-222 pour se structurer, soit cette protéine adopte un repliement tridimensionnel quand elle entre en interaction avec un de ses partenaires biologiques.

Dans le cas de l'interaction lamine A-SREBP1, nous avons choisi de nous focaliser sur le domaine de liaison à l'ADN de SREBP1 après discussion avec le groupe de S. Shackleton. Je n'ai pas pu mettre en évidence une interaction entre SREBP1 et les fragments de lamine de type A testés au laboratoire. En revanche, notre collaboratrice, I. Duband-Goulet vient de montrer une interaction par GST pulldown entre SREBP1 et la lamine A mature ou SREBP1 et la prélamine A dans des conditions de faible concentration saline. Elle a aussi réalisé ces expériences avec notre concentration saline et perd l'interaction dans les deux cas. En conséquence, on observe une interaction électrostatique faible entre la lamine A mature ou la prélamine A et le fragment de liaison à l'ADN de SREBP1. Il serait intéressant de faire intervenir l'ADN de SREBP1 dans ce complexe afin d'observer s'il y a formation d'un trimère lamine-SREBP1-ADN. Cette expérience pourrait être réalisée par gel retard pour vérifier l'impact de la lamine sur le complexe SREBP1-ADN, puis par RMN afin de cartographier la surface d'interaction du complexe SREBP1/ADN sur la lamine. Pour finir, nous pourrions essayer de cristalliser ce trimère afin d'en résoudre la structure tridimensionnelle ce qui nous permettrait d'observer le comportement des résidus propre à la lamine A mature (554-646) ou à la prélamine A (554-664). Ce serait aussi les premières informations structurales sur l'implication de la lamina nucléaire dans la régulation de la transcription.

Enfin, j'ai participé au dialogue entre notre laboratoire et les hôpitaux engagés dans l'identification des mutations de la lamine de type A causant des maladies génétiques. En particulier, j'ai caractérisé le mutant R439C de la lamine de type A. Cette mutation découverte par le groupe des Pr P.M. Steijlen et F.C.S. Ramaekers de l'hôpital de Maastricht, localisée dans le domaine globulaire de la lamine A, entraîne une forme de FPLD avec un fonctionnement anormal des muscles et des anomalies du squelette typiques des laminopathies progéroïdes. Le fait de modifier une arginine en une cystéine ne modifie pas la structure tridimensionnelle et la stabilité thermique du domaine de type immunoglobuline, comme observé dans le cas des autres mutations FPLD. En revanche, l'introduction de cette cystéine supplémentaire en plus de celle déjà présente dans le domaine de type immunoglobuline natif entraîne la formation d'oligomères plus complexes du domaine C-terminal globulaire par l'intermédiaire des ponts disulfures. Les autres mutations FPLD de la lamine ne modifient pas le profil d'oligomérisation du domaine de type immunoglobuline. Je me suis donc intéressée à ce processus et j'ai observée l'effet de cette oligomérisation sur l'interaction avec l'ADN par retard sur gel. Dans cette expérience, on a remarqué que le domaine de type immunoglobuline de la lamine mutée R439C ne formait plus de complexes bien déterminés avec l'ADN comme la lamine sauvage. En effet, on observe des smears dus à la formation de complexes instables et transitoires entre le mutant de la lamine R439C et l'ADN. On a aussi remarqué que plus on avait d'oligomères de tailles importantes, moins on observait de déplacement de l'ADN dans le gel. Cela peut être dû à la formation d'énormes complexes autour de l'ADN qui ne rentrent pas dans les mailles du gel. En conclusion, cette mutation de la lamine modifie le comportement du domaine de type immunoglobuline de la lamine envers l'ADN. On peut se demander si muter la cystéine native de ce domaine de la lamine dans le mutant R439C permettrait de récupérer les propriétés d'interaction de la lamine avec l'ADN. C'est une des pistes qui serait aujourd'hui à exploiter. En revanche, cette cystéine native est localisée à l'opposé des mutations FPLD sur la structure du domaine de type immunoglobuline de la lamine A. En conséquence, on peut penser que l'on retrouvera les propriétés de dimérisation du domaine de type immunoglobuline mais peut être pas l'interaction avec l'ADN. On peut aussi se demander si la destabilisation du complexe ADN-lamine A provoquée par la mutation et liée au phénomène d'oligomérisation n'est pas un reflet d'un impact plus important de cette mutation R439C. En effet, cette mutation pourrait destabiliser d'autres complexes lamine A-partenaires dont l'interaction avec l'ADN serait un exemple.

A cette occasion, j'ai soulevé la question de la régulation de l'oxydation des cystéines au sein de la lamina nucléaire. Afin de pouvoir apporter des éléments de réponse, j'ai

commencé des expériences sur les lames de type A *in vivo*. Nous n'avons pas encore pu étayer notre réponse à ce sujet. Cette question constitue aussi pour le laboratoire une perspective intéressante de ce travail.

Chapitre 5 : Matériels et méthodes

I. Expression, production et purification

1. La plate-forme de production de protéines recombinantes chez *E. coli* du DIEP

Afin d'obtenir des protéines solubles ou d'améliorer le rendement de surexpression de certaines protéines, la plate-forme de production de protéines recombinantes chez *E. coli* du DIEP a mis en place un criblage systématique de plusieurs conditions expérimentales (7 partenaires de fusion, 3 souches d'expression, et 2 températures d'expression) (Braud et al., 2005). Pour rendre ce criblage d'un grand nombre de conditions réalisable en un temps raisonnable, un système en microplaque ainsi qu'un traitement en parallèle des échantillons a été mis en place. Les tests d'expression des protéines se déroulent en 2 étapes distinctes :

- * Une première étape de criblage des conditions d'expression réalisée à petite échelle sur microplaques en volume de 250 µL.
- * Puis, une fois les meilleures conditions d'expression de protéine soluble déterminées, une production à grande échelle pour obtenir les protéines en quantité appréciable.

Au-delà de la possibilité de tester un grand nombre de conditions en parallèle, ce système d'expression permet également de produire plusieurs domaines ou protéines simultanément, ce qui est difficilement réalisable avec des techniques d'expression classiques. La stratégie de production de protéines solubles dans le cadre de cette plate-forme peut se décomposer en trois étapes principales :

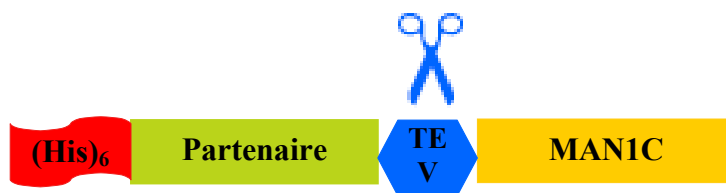


Figure 64 : Représentation des constructions issues de la plateforme de production de protéines recombinantes chez *E. coli* du DIEP (Braud et al., 2005).

Cette plate-forme de production de protéines recombinantes chez *E. coli* du DIEP a été mise en place au cours de ma thèse, donc dans les paragraphes suivants, certains plasmides en seront issus. A notre avantage, certains de nos collaborateurs nous fournissent aussi des plasmides, donc nous avons utilisé cette plate-forme dans le cas de protéines dont la surexpression posait problème.

2. Les différentes constructions de la région C-terminale de MAN1

Les différents plasmides de MAN1 nous ont été fournis par H.J. Worman. Nous avons trois plasmides initiaux pGEX-4T-1 qui codent pour une fusion GST, un site de coupure à la thrombine et notre protéine d'intérêt :

- MAN1C^A (655-775), le premier domaine de la région C-terminale de MAN1.
- MAN1C^B (658-910), la région C-terminale entière de MAN1.
- MAN1-UHM (776-910), le deuxième domaine de la région C-terminale de MAN1 qui est prédit par le bioinformatique comme un domaine UHM.

A. MAN1C^A

Ce plasmide pGEX-4T-1 (Amersham) de MAN1C^A a été surexprimé dans des bactéries de *E. coli* BL21 DE3 Gold à 37°C pendant 3h. Comme on obtenait peu de surexpression de notre protéine de fusion, d'autres conditions ont été testées :

- 3 souches (*E. coli* BL21 DE3 Star-Gold-Rosetta pLys S),
- 2 températures de culture (37°C et 20 °C),
- 3 temps de culture après induction (4h, une nuit et 2 jours),
- 2 DO d'induction (0,8 et 1,2) et 2 concentrations en IPTG (0,1 et 0,4 mM).

Une fois les conditions d'expression sélectionnées, nous avons mis au point les conditions de purification de MAN1C^A. Une purification par affinité sur colonne GS4B (Glutathion Sepharose 4B, Amersham) a été réalisée avec coupure à la thrombine sur colonne. Après action de la thrombine, on élue la protéine clivée avec notre tampon de purification. De cette façon, on récupère uniquement notre protéine d'intérêt sans la protéine de fusion. Ensuite, nous avons ajouté une étape de purification par échangeuse d'ions.

Nous avons besoin d'une protéine concentrée entre 0,5 et 1mM pour enregistrer les expériences RMN mais notre protéine précipite à la concentration. Par conséquent, nous avons réalisé un crible de solubilité afin de déterminer les conditions optimales de solubilité de notre domaine pour une étude RMN. Ce crible est basé sur les cribles de cristallogénèse et consiste à tester :

- différents tampons à différents pH,
- différentes concentrations en tampons,
- plusieurs sels à différentes concentrations.

Les conditions de solubilité sélectionnées pour MAN1C^A nous ont permis de réaliser de nombreuses expériences RMN et d'aboutir à la structure de ce domaine de la région C-terminale de MAN1 (Caputo et al., 2006a; Caputo et al., 2006b).

B. MAN1-UHM

Le plasmide de MAN1-UHM a été modifié au sein de la plate-forme de production de protéines recombinantes chez *E. coli* du DIEP. Un plasmide qui code pour un tag histidine, une fusion GST, un site de coupure à la TEV et MAN1-UHM a été surexprimé dans des bactéries de *E. coli* BL21 AI à 37°C pendant 3h. Une purification sur colonne GS4B (Glutathion Sepharose 4B, Amersham) a ensuite été réalisée ainsi qu'une coupure à la TEV. Une fois MAN1-UHM récupérée, elle s'agrège rapidement.

C. MAN1C^B

Le plasmide de MAN1C^B a été modifié au sein de la plate-forme de production de protéines recombinantes chez *E. coli* du DIEP. Un plasmide qui code pour un tag histidine, une fusion ZZ, un site de coupure à la TEV et MAN1C^B a été surexprimé dans des bactéries de *E. coli* BL21 DE3 Star à 37°C pendant 3h. Une purification par affinité sur colonne IgG Sepharose 6 Fast Flow (Amersham) a ensuite été réalisée ainsi qu'une coupure à la TEV. Une fois MAN1C^B récupérée, une filtration sur gel a été effectuée. Nous avons ensuite utilisé des conditions de solubilité similaires à MAN1C^A afin de pouvoir comparer les spectres RMN des deux protéines.

3. Le domaine MH2 de Smad3

Le plasmide pGEX4-T2 (Amersham) du domaine MH2 de Smad3 (MH2-Smad3) nous a été fourni par H.J. Worman. Ce plasmide qui code pour une fusion GST, un site de coupure à la thrombine et le domaine MH2-Smad3 a été surexprimé dans des bactéries de *E. coli* BL21 DE3 Star à 25°C sur la nuit. Plusieurs stratégies de purification ont été testées :

- purification standard sur colonne d'affinité GS4B (Glutathion Sepharose 4B, Amersham), puis coupure à la thrombine et élution.

- purification sur colonne d'affinité GS4B en PBS avec 1M NaCl et 0,5% triton X-100, puis élution avec 100 mM glutathion pH 8,

- * coupure à la thrombine en solution et ajout sur la colonne de MAN1C^B

- * ou coupure à la thrombine en solution et repassage sur GS4B pour enlever la GST,

- * ou coupure à la thrombine en solution et ajout de MAN1C^B, puis filtration sur gel.

- purification sur colonne d'affinité GS4B en PBS avec 1M NaCl et 0,5% triton X-100, puis ajout de MAN1C^B pure, coupure à la thrombine sur colonne puis élution et filtration sur gel.

- mise en contact de MAN1C^B pure et de la culture de GST-MH2-Smad3 avant la colonne d'affinité, puis purification sur colonne d'affinité GS4B en PBS avec 1M NaCl et 0,5% triton X-100.

- mise en contact des cellules ayant surexprimées ZZ-MAN1C^B et de celles ayant surexprimées GST- MH2-Smad3, purification sur colonne d'affinité GS4B en PBS avec 1M NaCl et 0,5% triton X-100, coupure sur colonne à la thrombine, élution et filtration sur gel.

4. Lamine A/C

A. *Les protéines recombinantes*

Les plasmides pGEX4-T1 (Amersham) des différentes constructions de lamine A/C nous ont été fournis par H.J. Worman. Ces plasmides codent pour une fusion GST, un site de coupure à la thrombine et la lamine (figure 65) :

- GST-lamine 411-553,
- GST-lamine 411-572,
- GST-lamine 411-646,
- GST-lamine 389-646,
- GST-lamine 411-664,
- GST-lamine 411-553-R439C.

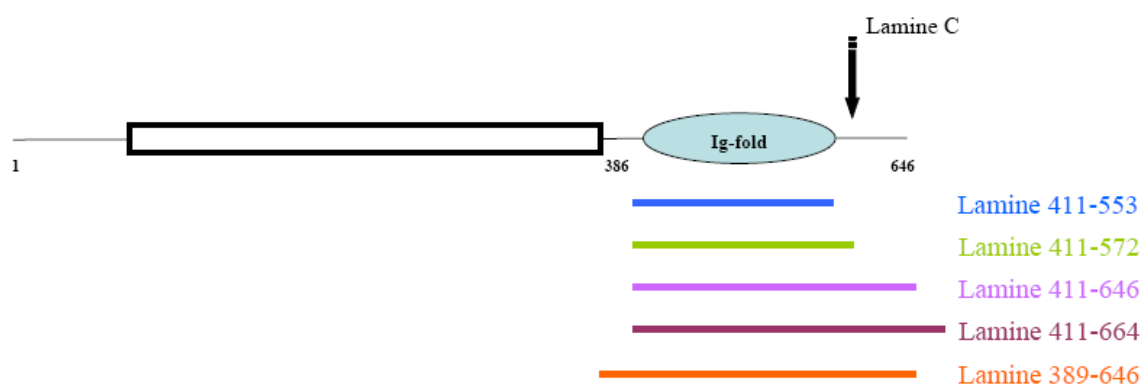


Figure 65 : Schéma représentant les fragments de lamine A ou C utilisés dans nos études.

Toutes ces constructions ont été surexprimées dans des bactéries de *E. coli* BL21 DE3 Star à 37°C pendant 3h. Les fusions sont ensuite purifiées par chromatographie d'affinité sur GS4B et coupées à la thrombine.

B. La protéine entière

Les lamines sont extraites d'après un protocole d'extraction de la matrice nucléaire (Fey et al., 1984). Sur les conseils de Michel B. Toledano du SBGM au CEA de Saclay, nous avons modifié ce protocole en rajoutant une étape d'hydrolyse des acides nucléiques. Cette expérience a aussi été réalisée en présence de NEM afin de bloquer la formation de ponts disulfures supplémentaires *in vitro*. Pour ces expériences, nous avons utilisé des cellules HeLa ou des fibroblastes de malades avec la mutation R439C fournit par nos collaborateurs de Maastricht.

Ces cellules après une croissance suffisante, sont rincées avec du PBS. Les cellules sont cassées par méthode chimique avec un tampon CSK (100mM NaCl, 300mM sucrose, 10mM PIPES, 3mM MgCl₂, 0,5% Triton X-100 et 1,2 mM PMSF, pH 6,8) et plusieurs temps d'attente à 0°C. La matrice est récupérée par centrifugation et digérée à 20°C dans un tampon CSK contenant 50mM NaCl et de la benzonase. On ajoute ensuite 250 mM de sulfate d'ammonium afin de purifier nos protéines d'intérêt. Après centrifugation, le culot est repris dans un tampon de migration pour les gels avec ou sans réducteur. La même expérience est réalisée en parallèle en ajoutant 40mM de NEM à chaque étape. Ce produit se lie de façon covalente aux cystéines libres et permet de bloquer la formation de ponts disulfures supplémentaires *in vitro*. Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE 5% et transférées membrane de nitrocellulose. La révélation s'effectue à l'aide d'un anticorps primaire anti-lamine A fournit par B. Buendia puis d'un anticorps secondaire de révélation.

5. L'Emerine

Les différents plasmides d'émerine que nous avons utilisés nous ont été fournis par H.J. Worman :

- pET-19b (His-tag, site de coupure à l'entérokinase, suivi de l'émerine 1-187)
- pETM30 (His-tag, GST, site de coupure à la TEV, l'émerine 1-187, site de coupure à la TEV suivi de la lamine 411-566) : **TEV#1**.

Le plasmide pET-19b a ensuite été modifié au sein de la plate-forme de production de protéines recombinantes chez *E. coli* du DIEP à partir de plasmides commerciaux (Invitrogen) et nous avons donc travaillé sur de nouvelles constructions :

- E15** : GST, site de coupure à l'entérokinase suivi de l'émerine 1-187
- E17** : His-tag, site de coupure à l'entérokinase suivi de l'émerine 1-187
- E24** : Emerine 1-187, site de coupure à l'entérokinase, suivi de la GST
- E42** : Emerine 1-187, site de coupure à l'entérokinase, suivi d'un His-tag

-**E49** : Thioredoxine, site de coupure à l'entérokinase, émerine 1-187 suivie de la thioredoxine.

A. Souches de *E. coli* utilisées pour l'expression de l'émerine 1-187

Les nouvelles constructions ont ensuite été surexprimées avec différentes souches de bactéries de *E. coli* :

- BL21 DE3 Rosetta : améliore l'expression des protéines qui contiennent des codons rares
- BL21 AI : permet une meilleure régulation de l'induction

Toutes les constructions E15, E17, E24, E42 et E49 ont été exprimées dans des souches de *E. coli* BL21 AI à 37°C pendant 3h. La construction E17 a aussi été exprimée dans des souches de *E. coli* BL21 DE3 Rosetta à 37°C pendant 3h.

B. Co-expression de l'émerine avec des protéines chaperons

Quand une protéine se replie difficilement, elle est exprimée dans les corps d'inclusion de la bactérie. Une technique consiste à co-exprimer ces protéines avec des protéines chaperons qui vont faciliter leur repliement. Le plasmide pG-KJE3 de ces protéines nous a été fourni par T. Yura (Nishihara et al., 1998). Il code pour cinq protéines chaperons : DnaJ, DnaK, GroEL, GroES, GrpE. Nous avons co-exprimé les cinq plasmides de l'émerine obtenus par la plate-forme avec les protéines chaperons dans des souches de *E. coli* BL21 DE3 Gold à 37°C pendant 3h. Nous avons ensuite réalisé une purification d'affinité pour chacune des constructions.

C. Renaturation de l'émerine produite en corps d'inclusion

Cette technique consiste à récupérer la protéine qui est exprimée dans les corps d'inclusions et à la dénaturer puis tenter de la replier *in vitro*.

E17 a été exprimée dans des souches de *E. coli* BL21 AI à 37°C pendant 3h. Dans ce cas, on récupère les corps d'inclusion que l'on traite avec du triton X-100. L'émerine et les protéines de *E. coli* des corps d'inclusion sont ensuite dénaturées une nuit, sous agitation à 4°C, dans un tampon contenant 6M de Guanidine (tampon de dénaturation : 6M Guanidine, 50mM Tris pH 8, 150mM NaCl et 5mM β -mercaptoéthanol). Il faut réaliser l'expérience en présence d'une forte concentration de réducteur afin d'éliminer tous les ponts disulfures. Une purification d'affinité sur colonne de nickel est ensuite réalisée en conditions dénaturantes. L'étape finale est la renaturation de la protéine par des dilutions successives au 20^{ème} dans un tampon ne contenant plus de Guanidine.

D. Production de l'émerine à partir du plasmide TEV#1

Dans ce cas, le plasmide code pour une protéine dont la séquence correspond à trois protéines : la protéine de fusion GST, l'émerine 1-187 et la lamine qui se surexprime très bien et peut aider à la surexpression de l'émerine. Cette construction TEV#1 a été exprimée dans des souches de *E. coli* BL21 DE3 Star à 20°C sur la nuit. La fusion est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité sur GS4FF et coupée à la TEV sur colonne. Les différentes protéines récupérées sont ensuite séparées par filtration sur gel.

6. SREBP1

Le plasmide pGEX4-T3 (Amersham) de SREBP1 320-405 nous a été fourni par S. Shackelton (Lloyd et al., 2002). Ce plasmide code pour une fusion GST, un site de coupure à la thrombine et SREBP1 320-405. Cette construction a été surexprimée dans des bactéries de *E. coli* BL21 DE3 Star à 37°C pendant 2h. La fusion est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité sur GS4B et coupée à la thrombine. La protéine récupérée est ensuite purifiée par filtration sur gel avec un tampon 100 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 8.

II. Caractérisation structurale

1. Caractérisation par Dichroïsme Circulaire (DC)

Le dichroïsme circulaire (DC) est une méthode spectrophotométrique qui mesure l'absorbance optique des molécules asymétriques en solution. Les spectres DC dans l'ultraviolet (UV) lointain des protéines sont très sensibles à la structure secondaire des protéines, les spectres d'UV proche reflètent l'environnement chimique des chaînes latérales aromatiques et des ponts disulfure.

L'utilisation du DC permet aussi de déterminer si la protéine est stable pour l'étude RMN qui suivra. Cette technique permet en effet de déterminer la température de dénaturation de la protéine. Nous avons utilisé cette technique afin de déterminer les éléments de structure secondaire de MAN1 et de vérifier la stabilité du mutant R439C des lamines de type A (pour le mutant R439C de la lamine voir article chapitre 3).

Pour les expériences de DC, les échantillons de MAN1C^A utilisés étaient à 20 ou 80 µM dans un tampon PBS à pH 7,4. Ces expériences ont été réalisées avec un appareil de DC Jobin Yvon CD6. Les spectres ont été enregistrés entre 190 et 290 nm pour l'échantillon à 20 µM et entre 250 et 330 nm pour l'échantillon à 80 µM sur un échantillon de 1 ml (longueur optique : 1 cm) à 20 °C.

2. Préparation des échantillons pour la RMN

Les échantillons RMN contiennent 90% H₂O/10% D₂O ou 99,9% D₂O, 1 mM EDTA, 2 mM TCEP ou 5 mM DTT, un cocktail d'inhibiteur de protéases (SIGMA), 0,01% NaN₃ et 0,5 mM TSP comme référence de déplacement chimique. Les tampons utilisés sont :

- ❖ pour MAN1C^A : 50 mM Phosphate, 150 mM NaCl, pH 6,0
- ❖ pour MAN1C^B : 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 6,0
- ❖ pour toutes les constructions de lamine : 20 mM Tris, pH 6,3
- ❖ pour l'émerine 1-187 : 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 6,3

3. Expériences RMN et modélisation

Les expériences ont été enregistrées à 30°C pour MAN1C^A, MAN1C^B, les constructions de lamines et l'émerine sur des spectromètres Bruker DRX-600 au CEA de Saclay et à l'université d'Evry ou sur le DRX-900 de l'université d'Utrecht (Hollande).

Les expériences utilisées pour l'attribution des déplacements chimiques et le calcul de la structure ont été décrites précédemment dans le cas de MAN1C^A (Caputo et al., 2006a; Caputo et al., 2006b).

III. Interactions

1. GST pulldown

20 à 200 µg de protéines purifiées fusionnées à la GST (GST-lamine, GST seule) sont fixées sur 50µl de billes GS4B (Amersham). Les interactions non spécifiques sont éliminées par des lavages avec un tampon contenant 1 M NaCl, suivis de lavage en tampon d'incubation. 20 ou 200 µg de protéines ligands (SREBP1) sont incubées avec ces billes dans le tampon d'incubation (100 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 8) pendant au moins 1h à 4°C sous agitation. Les protéines ligands qui n'interagissent pas avec les protéines fixées sur les billes sont éliminées par des lavages avec les tampons d'incubation. Les billes sont analysées sur gels SDS-PAGE 15% révélé au bleu de coomassie.

2. Cartographie de surfaces d'interaction par RMN

Les expériences permettant de suivre les variations de déplacements chimiques induites par l'addition d'un ligand sont des ¹H-¹⁵N-HSQC enregistrées à 600 MHz sur des échantillons entre 0,1 et 0,5 mM de protéine (Lamine 411-553 et lamine 411-646). Les variations de déplacements chimiques sont pondérées par le rapport de rapports gyromagnétiques ¹⁵N/¹H (~0,1) : $|\Delta\delta| = |\Delta\delta(^1\text{H})| + 0,1 * |\Delta\delta(^{15}\text{N})|$, où $\Delta\delta = \delta_i - \delta_0$ (δ_i est le

déplacement chimique correspondant à l'ajout de ligand numéro i et δ_0 est le déplacement chimique avant l'ajout de ligand). En considérant que l'échange entre les formes libres et liées (protéine/ligand) est rapide, et que l'affinité de ces interactions est faible, on peut approximer que la concentration de ligand libre est égale à la concentration de ligand lié.

Références

- Aaronson, R.P. and Blobel, G. (1975) Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 1007-1011.
- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. and Gerace, L. (1986) The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature*, **323**, 560-564.
- Arimura, T., Helbling-Leclerc, A., Massart, C., Varnous, S., Niel, F., Lacene, E., Fromes, Y., Toussaint, M., Mura, A.M., Keller, D.I., Amthor, H., Isnard, R., Malissen, M., Schwartz, K. and Bonne, G. (2005) Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum Mol Genet*, **14**, 155-169.
- Bakay, M., Wang, Z., Melcon, G., Schiltz, L., Xuan, J., Zhao, P., Sartorelli, V., Seo, J., Pegoraro, E., Angelini, C., Shneiderman, B., Escolar, D., Chen, Y.W., Winokur, S.T., Pachman, L.M., Fan, C., Mandler, R., Nevo, Y., Gordon, E., Zhu, Y., Dong, Y., Wang, Y. and Hoffman, E.P. (2006) Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb-MyoD pathways in muscle regeneration. *Brain*, **129**, 996-1013.
- Beaudouin, J., Gerlich, D., Daigle, N., Eils, R. and Ellenberg, J. (2002) Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell*, **108**, 83-96.
- Bednenko, J., Cingolani, G. and Gerace, L. (2003) Nucleocytoplasmic transport: navigating the channel. *Traffic*, **4**, 127-135.
- Belgareh, N. and Doye, V. (1997) Dynamics of nuclear pore distribution in nucleoporin mutant yeast cells. *J Cell Biol*, **136**, 747-759.
- Belmont, A.S., Zhai, Y. and Thilenius, A. (1993) Lamin B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and electron microscopy tomography. *J Cell Biol*, **123**, 1671-1685.
- Bengtsson, L. and Wilson, K.L. (2004) Multiple and surprising new functions for emerin, a nuclear membrane protein. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 73-79.
- Bengtsson, L. and Wilson, K.L. (2006) Barrier-to-autointegration factor phosphorylation on Ser-4 regulates emerin binding to lamin A in vitro and emerin localization in vivo. *Mol Biol Cell*, **17**, 1154-1163.
- Bergo, M.O., Gavino, B., Ross, J., Schmidt, W.K., Hong, C., Kendall, L.V., Mohr, A., Meta, M., Genant, H., Jiang, Y., Wisner, E.R., Van Bruggen, N., Carano, R.A., Michaelis, S., Griffey, S.M. and Young, S.G. (2002) Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13049-13054.
- Bernasconi, P., Di Blasi, C., Mora, M., Morandi, L., Galbiati, S., Confalonieri, P., Cornelio, F. and Mantegazza, R. (1999) Transforming growth factor-beta1 and fibrosis in congenital muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord*, **9**, 28-33.
- Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Mancini, M., Regis, S., Romeo, G. and Toniolo, D. (1994) Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, **8**, 323-327.
- Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Becane, H.M., Hammouda, E.H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C.R., Gary, F., Urtizberea, J.A., Duboc, D., Fardeau, M., Toniolo, D. and Schwartz, K. (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, **21**, 285-288.
- Bonne, G. and Levy, N. (2003) LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet*, **362**, 1585-1586; author reply 1586.
- Bork, P., Holm, L. and Sander, C. (1994) The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol*, **242**, 309-320.

- Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J.M., Mahy, N.L., Ellis, J.A. and Bickmore, W.A. (2001) The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet*, **10**, 211-219.
- Brachner, A., Reipert, S., Foisner, R. and Gotzmann, J. (2005) LEM2 is a novel MAN1-related inner nuclear membrane protein associated with A-type lamins. *J Cell Sci*, **118**, 5797-5810.
- Braud, S., Moutiez, M., Belin, P., Abello, N., Drevet, P., Zinn-Justin, S., Courcon, M., Masson, C., Dassa, J., Charbonnier, J.B., Boulain, J.C., Menez, A., Genet, R. and Gondry, M. (2005) Dual expression system suitable for high-throughput fluorescence-based screening and production of soluble proteins. *J Proteome Res*, **4**, 2137-2147.
- Broers, J.L., Machiels, B.M., Kuijpers, H.J., Smedts, F., van den Kieboom, R., Raymond, Y. and Ramaekers, F.C. (1997) A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochem Cell Biol*, **107**, 505-517.
- Broers, J.L., Machiels, B.M., van Eys, G.J., Kuijpers, H.J., Manders, E.M., van Driel, R. and Ramaekers, F.C. (1999) Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci*, **112** (Pt 20), 3463-3475.
- Broers, J.L. and Ramaekers, F.C. (2004) Dynamics of nuclear lamina assembly and disassembly. *Symp Soc Exp Biol*, 177-192.
- Bucci, M. and Wente, S.R. (1997) In vivo dynamics of nuclear pore complexes in yeast. *J Cell Biol*, **136**, 1185-1199.
- Buendia, B. and Courvalin, J.C. (1997) Domain-specific disassembly and reassembly of nuclear membranes during mitosis. *Exp Cell Res*, **230**, 133-144.
- Cai, M., Huang, Y., Ghirlando, R., Wilson, K.L., Craigie, R. and Clore, G.M. (2001) Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *Embo J*, **20**, 4399-4407.
- Cao, H. and Hegele, R.A. (2000) Nuclear lamin A/C R428Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 109-112.
- Capanni, C., Mattioli, E., Columbaro, M., Lucarelli, E., Parnaik, V.K., Novelli, G., Wehnert, M., Cenni, V., Maraldi, N.M., Squarzoni, S. and Lattanzi, G. (2005) Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum Mol Genet*, **14**, 1489-1502.
- Caputo, S., Couprie, J., Duband-Goulet, I., Konde, E., Lin, F., Braud, S., Gondry, M., Gilquin, B., Worman, H.J. and Zinn-Justin, S. (2006a) The carboxyl-terminal nucleoplasmic region of MAN1 exhibits a DNA binding winged helix domain. *J Biol Chem*.
- Caputo, S., Lin, F., Gilquin, B., Worman, H.J., Zinn-Justin, S. and Couprie, J. (2006b) NMR Assignment of Region 655-775 of Human MAN1. *J Biomol NMR*.
- Caux, F., Dubosclard, E., Lascols, O., Buendia, B., Chazouilleres, O., Cohen, A., Courvalin, J.C., Laroche, L., Capeau, J., Vigouroux, C. and Christin-Maitre, S. (2003) A new clinical condition linked to a novel mutation in lamins A and C with generalized lipoatrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 1006-1013.
- Chaudhary, N. and Courvalin, J.C. (1993) Stepwise reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *J Cell Biol*, **122**, 295-306.
- Chen, L., Lee, L., Kudlow, B.A., Dos Santos, H.G., Sletvold, O., Shafeghati, Y., Botha, E.G., Garg, A., Hanson, N.B., Martin, G.M., Mian, I.S., Kennedy, B.K. and Oshima, J. (2003) LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet*, **362**, 440-445.
- Chen, X., Weisberg, E., Fridmacher, V., Watanabe, M., Naco, G. and Whitman, M. (1997) Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature*, **389**, 85-89.
- Chigira, M., Kato, K., Mashio, K. and Shinozaki, T. (1991) Symmetry of bone lesions in osteopoikilosis. Report of 4 cases. *Acta Orthop Scand*, **62**, 495-496.

- Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E. and Burley, S.K. (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, **364**, 412-420.
- Clements, L., Manilal, S., Love, D.R. and Morris, G.E. (2000) Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochem Biophys Res Commun*, **267**, 709-714.
- Cohen, M., Lee, K.K., Wilson, K.L. and Gruenbaum, Y. (2001) Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends Biochem Sci*, **26**, 41-47.
- Columbaro, M., Mattioli, E., Lattanzi, G., Rutigliano, C., Ognibene, A., Maraldi, N.M. and Squarzoni, S. (2001) Staurosporine treatment and serum starvation promote the cleavage of emerin in cultured mouse myoblasts: involvement of a caspase-dependent mechanism. *FEBS Lett*, **509**, 423-429.
- Courvalin, J.C., Segil, N., Blobel, G. and Worman, H.J. (1992) The lamin B receptor of the inner nuclear membrane undergoes mitosis-specific phosphorylation and is a substrate for p34cdc2-type protein kinase. *J Biol Chem*, **267**, 19035-19038.
- Cronshaw, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T. and Matunis, M.J. (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **158**, 915-927.
- Cronshaw, J.M. and Matunis, M.J. (2003) The nuclear pore complex protein ALADIN is mislocalized in triple A syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5823-5827.
- Daigle, N., Beaudouin, J., Hartnell, L., Imreh, G., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J. and Ellenberg, J. (2001) Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J Cell Biol*, **154**, 71-84.
- de Noronha, C.M., Sherman, M.P., Lin, H.W., Cavrois, M.V., Moir, R.D., Goldman, R.D. and Greene, W.C. (2001) Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science*, **294**, 1105-1108.
- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C.L., Munnich, A., Le Merrer, M. and Levy, N. (2003) Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*, **300**, 2055.
- De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J.M., Tazir, M., Kassouri, N., Szepietowski, P., Hammadouche, T., Vandenberghe, A., Stewart, C.L., Grid, D. and Levy, N. (2002) Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet*, **70**, 726-736.
- Dechat, T., Korbei, B., Vaughan, O.A., Vlcek, S., Hutchison, C.J. and Foisner, R. (2000) Lamina-associated polypeptide 2alpha binds intranuclear A-type lamins. *J Cell Sci*, **113 Pt 19**, 3473-3484.
- Delbarre, E., Tramier, M., Coppey-Moisan, M., Gaillard, C., Courvalin, J.C. and Buendia, B. (2006) The truncated prelamin A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters segregation of A-type and B-type lamin homopolymers. *Hum Mol Genet*, **15**, 1113-1122.
- Dessev, G.N., Iovcheva-Dessev, C. and Goldman, R.D. (1990) Lamin dimers. Presence in the nuclear lamina of surf clam oocytes and release during nuclear envelope breakdown. *J Biol Chem*, **265**, 12636-12641.
- Dhe-Paganon, S., Werner, E.D., Chi, Y.I. and Shoelson, S.E. (2002) Structure of the globular tail of nuclear lamin. *J Biol Chem*, **277**, 17381-17384.
- Dimitrova, D.S. and Berezney, R. (2002) The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells. *J Cell Sci*, **115**, 4037-4051.
- Doring, V. and Stick, R. (1990) Gene structure of nuclear lamin LIII of *Xenopus laevis*; a model for the evolution of IF proteins from a lamin-like ancestor. *Embo J*, **9**, 4073-4081.

- Dorner, D., Vlcek, S., Foeger, N., Gajewski, A., Makolm, C., Gotzmann, J., Hutchison, C.J. and Foisner, R. (2006) Lamina-associated polypeptide 2{alpha} regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *J Cell Biol*, **173**, 83-93.
- Dreuillet, C., Tillit, J., Kress, M. and Ernoult-Lange, M. (2002) In vivo and in vitro interaction between human transcription factor MOK2 and nuclear lamin A/C. *Nucleic Acids Res*, **30**, 4634-4642.
- Duband-Goulet, I. and Courvalin, J.C. (2000) Inner nuclear membrane protein LBR preferentially interacts with DNA secondary structures and nucleosomal linker. *Biochemistry*, **39**, 6483-6488.
- Dunnigan, M.G., Cochrane, M.A., Kelly, A. and Scott, J.W. (1974) Familial lipotrophic diabetes with dominant transmission. A new syndrome. *Q. J. Med.*, **43**, 33-48.
- Dwyer, N. and Blobel, G. (1976) A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *J Cell Biol*, **70**, 581-591.
- Ellenberg, J., Siggia, E.D., Moreira, J.E., Smith, C.L., Presley, J.F., Worman, H.J. and Lippincott-Schwartz, J. (1997) Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol*, **138**, 1193-1206.
- Ellis, D.J., Jenkins, H., Whitfield, W.G. and Hutchison, C.J. (1997) GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in *Xenopus* egg extract and reveal the function of the lamina in DNA replication. *J Cell Sci*, **110** (Pt 20), 2507-2518.
- Ellis, J.A., Craxton, M., Yates, J.R. and Kendrick-Jones, J. (1998) Aberrant intracellular targeting and cell cycle-dependent phosphorylation of emerin contribute to the Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype. *J Cell Sci*, **111** (Pt 6), 781-792.
- Erber, A., Riemer, D., Bovenschulte, M. and Weber, K. (1998) Molecular phylogeny of metazoan intermediate filament proteins. *J Mol Evol*, **47**, 751-762.
- Eriksson, M., Brown, W.T., Gordon, L.B., Glynn, M.W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M.R., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Berglund, P., Dutra, A., Pak, E., Durkin, S., Csoka, A.B., Boehnke, M., Glover, T.W. and Collins, F.S. (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, **423**, 293-298.
- Fahrenkrog, B. and Aeby, U. (2003) The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 757-766.
- Fairley, E.A., Kendrick-Jones, J. and Ellis, J.A. (1999) The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane. *J Cell Sci*, **112** (Pt 15), 2571-2582.
- Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M.R., Porcu, M., Frenneaux, M., Atherton, J., Vidaillet, H.J., Jr., Spudich, S., De Girolami, U., Seidman, J.G., Seidman, C., Muntoni, F., Muehle, G., Johnson, W. and McDonough, B. (1999) Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*, **341**, 1715-1724.
- Favreau, C., Higuier, D., Courvalin, J.C. and Buendia, B. (2004) Expression of a mutant lamin A that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy inhibits in vitro differentiation of C2C12 myoblasts. *Mol Cell Biol*, **24**, 1481-1492.
- Fawcett, D.W. (1966) On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. *Am J Anat*, **119**, 129-145.
- Fey, E.G., Wan, K.M. and Penman, S. (1984) Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: three-dimensional organization and protein composition. *J Cell Biol*, **98**, 1973-1984.
- Fisher, D.Z., Chaudhary, N. and Blobel, G. (1986) cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 6450-6454.

- Foisner, R. (2001) Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina. *J Cell Sci*, **114**, 3791-3792.
- Foisner, R. and Gerace, L. (1993) Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell*, **73**, 1267-1279.
- Frangioni, J.V. and Neel, B.G. (1993) Use of a general purpose mammalian expression vector for studying intracellular protein targeting: identification of critical residues in the nuclear lamin A/C nuclear localization signal. *J Cell Sci*, **105** (Pt 2), 481-488.
- Frenal, K., Callebaut, I., Wecker, K., Prochnicka-Chalufour, A., Dendouga, N., Zinn-Justin, S., Delepierre, M., Tomavo, S. and Wolff, N. (2006) Structural and functional characterization of the TgDRE multidomain protein, a DNA repair enzyme from *Toxoplasma gondii*. *Biochemistry*, **45**, 4867-4874.
- Frolov, M.V. and Dyson, N.J. (2004) Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci*, **117**, 2173-2181.
- Fuchs, E. and Weber, K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, **63**, 345-382.
- Furukawa, K., Fritze, C.E. and Gerace, L. (1998) The major nuclear envelope targeting domain of LAP2 coincides with its lamin binding region but is distinct from its chromatin interaction domain. *J Biol Chem*, **273**, 4213-4219.
- Furukawa, K. and Hotta, Y. (1993) cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *Embo J*, **12**, 97-106.
- Furukawa, K., Pante, N., Aebi, U. and Gerace, L. (1995) Cloning of a cDNA for lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) and identification of regions that specify targeting to the nuclear envelope. *Embo J*, **14**, 1626-1636.
- Gajiwala, K.S. and Burley, S.K. (2000) Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 110-116.
- Gant, T.M., Harris, C.A. and Wilson, K.L. (1999) Roles of LAP2 proteins in nuclear assembly and DNA replication; truncated LAP2[beta] proteins alter lamina assembly, envelope formation, nuclear size and DNA replication efficiency in *Xenopus laevis* egg extracts. *J. Cell Biol.*, **144**, 1083-1096.
- Garg, A., Speckman, R.A. and Bowcock, A.M. (2002) Multisystem dystrophy syndrome due to novel missense mutations in the amino-terminal head and alpha-helical rod domains of the lamin A/C gene. *Am J Med*, **112**, 549-555.
- Garg, A., Vinaitheerthan, M., Weatherall, P.T. and Bowcock, A.M. (2001) Phenotypic heterogeneity in patients with familial partial lipodystrophy (dunnigan variety) related to the site of missense mutations in lamin a/c gene. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 59-65.
- Gerace, L. and Blobel, G. (1980) The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell*, **19**, 277-287.
- Gerace, L. and Blobel, G. (1982) Nuclear lamina and the structural organization of the nuclear envelope. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **46 Pt 2**, 967-978.
- Gerace, L., Blum, A. and Blobel, G. (1978) Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J Cell Biol*, **79**, 546-566.
- Giro, M.G., Duvic, M., Smith, L.T., Kennedy, R., Rapini, R., Arnett, F.C. and Davidson, J.M. (1992) Buschke-Ollendorff syndrome associated with elevated elastin production by affected skin fibroblasts in culture. *J Invest Dermatol*, **99**, 129-137.
- Glass, C.A., Glass, J.R., Taniura, H., Hasel, K.W., Blevitt, J.M. and Gerace, L. (1993) The alpha-helical rod domain of human lamins A and C contains a chromatin binding site. *Embo J*, **12**, 4413-4424.

- Goldman, A.E., Maul, G., Steinert, P.M., Yang, H.Y. and Goldman, R.D. (1986) Keratin-like proteins that coisolate with intermediate filaments of BHK-21 cells are nuclear lamins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3839-3843.
- Goodchild, R.E. and Dauer, W.T. (2005) The AAA+ protein torsinA interacts with a conserved domain present in LAP1 and a novel ER protein. *J Cell Biol*, **168**, 855-862.
- Gotzmann, J. and Foissner, R. (2006) A-type lamin complexes and regenerative potential: a step towards understanding laminopathic diseases? *Histochem Cell Biol*, **125**, 33-41.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R.D., Shumaker, D.K. and Wilson, K.L. (2005) The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 21-31.
- Gruenbaum, Y., Wilson, K.L., Harel, A., Goldberg, M. and Cohen, M. (2000) Review: nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol*, **129**, 313-323.
- Haithcock, E., Dayani, Y., Neufeld, E., Zahand, A.J., Feinstein, N., Mattout, A., Gruenbaum, Y. and Liu, J. (2005) Age-related changes of nuclear architecture in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Haraguchi, T., Holaska, J.M., Yamane, M., Koujin, T., Hashiguchi, N., Mori, C., Wilson, K.L. and Hiraoka, Y. (2004) Emerin binding to Btf, a death-promoting transcriptional repressor, is disrupted by a missense mutation that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Biochem*, **271**, 1035-1045.
- Haraguchi, T., Koujin, T., Hayakawa, T., Kaneda, T., Tsutsumi, C., Imamoto, N., Akazawa, C., Sukegawa, J., Yoneda, Y. and Hiraoka, Y. (2000) Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *J Cell Sci*, **113** (Pt 5), 779-794.
- Harel, A., Goldberg, M., Ulitzur, N., and Gruenbaum, Y. (ed.). (1998) *Structural organization and biological roles of the nuclear lamina*. Textbook of Gene Therapy and Molecular Biology: From Basic Mechanism to Clinical Applications, Gene therapy Press, Palo Alto.
- Harris, C.A., Andryuk, P.J., Cline, S.W., Mathew, S., Siekierka, J.J. and Goldstein, G. (1995) Structure and mapping of the human thymopoietin (TMPO) gene and relationship of human TMPO beta to rat lamin-associated polypeptide 2. *Genomics*, **28**, 198-205.
- Hawryluk-Gara, L.A., Shibuya, E.K. and Wozniak, R.W. (2005) Vertebrate Nup53 interacts with the nuclear lamina and is required for the assembly of a Nup93-containing complex. *Mol Biol Cell*, **16**, 2382-2394.
- Heald, R. and McKeon, F. (1990) Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell*, **61**, 579-589.
- Hellemans, J., Preobrazhenska, O., Willaert, A., Debeer, P., Verdonk, P.C., Costa, T., Janssens, K., Menten, B., Van Roy, N., Vermeulen, S.J., Savarirayan, R., Van Hul, W., Vanhoenacker, F., Huylebroeck, D., De Paepe, A., Naeyaert, J.M., Vandesompele, J., Speleman, F., Verschueren, K., Coucke, P.J. and Mortier, G.R. (2004) Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nat Genet*, **36**, 1213-1218.
- Herrmann, H. and Aebi, U. (2000) Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 79-90.
- Herrmann, H. and Aebi, U. (2004) Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem*, **73**, 749-789.
- Hinds, P.W., Mitnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S.I. and Weinberg, R.A. (1992) Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*, **70**, 993-1006.
- Hodzic, D.M., Yeater, D.B., Bengtsson, L., Otto, H. and Stahl, P.D. (2004) Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J Biol Chem*, **279**, 25805-25812.

- Hofemeister, H., Kuhn, C., Franke, W.W., Weber, K. and Stick, R. (2002) Conservation of the gene structure and membrane-targeting signals of germ cell-specific lamin LIII in amphibians and fish. *Eur J Cell Biol*, **81**, 51-60.
- Hoffmann, K., Dreger, C.K., Olins, A.L., Olins, D.E., Shultz, L.D., Lucke, B., Karl, H., Kaps, R., Muller, D., Vaya, A., Aznar, J., Ware, R.E., Sotelo Cruz, N., Lindner, T.H., Herrmann, H., Reis, A. and Sperling, K. (2002) Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly). *Nat Genet*, **31**, 410-414.
- Holaska, J.M., Kowalski, A.K. and Wilson, K.L. (2004) Emerin caps the pointed end of actin filaments: evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *PLoS Biol*, **2**, E231.
- Holaska, J.M., Lee, K.K., Kowalski, A.K. and Wilson, K.L. (2003) Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro. *J Biol Chem*, **278**, 6969-6975.
- Holmer, L., Pezhman, A. and Worman, H.J. (1998) The human lamin B receptor/sterol reductase multigene family. *Genomics*, **54**, 469-476.
- Holt, I., Clements, L., Manilal, S., Brown, S.C. and Morris, G.E. (2001) The R482Q lamin A/C mutation that causes lipodystrophy does not prevent nuclear targeting of lamin A in adipocytes or its interaction with emerin. *Eur J Hum Genet*, **9**, 204-208.
- Hutchison, C.J. (1994) The Use of Cell-Free Extracts of Xenopus Eggs for Studying DNA Replication in vitro. In *The Cell Cycle: A Practical Approach*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Hutchison, C.J., Alvarez-Reyes, M. and Vaughan, O.A. (2001) Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J Cell Sci*, **114**, 9-19.
- Jackson, S.N., Howlett, T.A., McNally, P.G., O'Rahilly, S. and Trembath, R.C. (1997) Dunnigan-Kobberling syndrome: an autosomal dominant form of partial lipodystrophy. *Qjm*, **90**, 27-36.
- Jagatheesan, G., Thanumalayan, S., Muralikrishna, B., Rangaraj, N., Karande, A.A. and Parnaik, V.K. (1999) Colocalization of intranuclear lamin foci with RNA splicing factors. *J Cell Sci*, **112** (Pt 24), 4651-4661.
- Johnson, B.R., Nitta, R.T., Frock, R.L., Mounkes, L., Barbie, D.A., Stewart, C.L., Harlow, E. and Kennedy, B.K. (2004) A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9677-9682.
- Karabinos, A., Schunemann, J., Parry, D.A. and Weber, K. (2002) Tissue-specific co-expression and in vitro heteropolymer formation of the two small Brachiostoma intermediate filament proteins A3 and B2. *J. Mol. Biol.*, **316**, 127-137.
- Kellenberger, E., Stier, G. and Sattler, M. (2002) Induced folding of the U2AF35 RRM upon binding to U2AF65. *FEBS Lett*, **528**, 171-176.
- Kennedy, B.K., Barbie, D.A., Classon, M., Dyson, N. and Harlow, E. (2000) Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev*, **14**, 2855-2868.
- Kielkopf, C.L., Lucke, S. and Green, M.R. (2004) U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world. *Genes Dev*, **18**, 1513-1526.
- Kim, J.B. and Spiegelman, B.M. (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev*, **10**, 1096-1107.
- Kobberling, J., Willms, B., Kattermann, R. and Creutzfeldt, W. (1975) Lipodystrophy of the extremities. A dominantly inherited syndrome associated with lipatrophic diabetes. *Humangenetik*, **29**, 111-120.
- Krimm, I., Ostlund, C., Gilquin, B., Couprie, J., Hossenlopp, P., Mornon, J.P., Bonne, G., Courvalin, J.C., Worman, H.J. and Zinn-Justin, S. (2002) The Ig-like structure of the

- C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure (Camb)*, **10**, 811-823.
- Laguri, C., Gilquin, B., Wolff, N., Romi-Lebrun, R., Courchay, K., Callebaut, I., Worman, H.J. and Zinn-Justin, S. (2001) Structural characterization of the LEM motif common to three human inner nuclear membrane proteins. *Structure (Camb)*, **9**, 503-511.
- Lam, K.S. and Kasper, C.B. (1979) Electrophoretic analysis of three major nuclear envelope polypeptides. Topological relationship and sequence homology. *J Biol Chem*, **254**, 11713-11720.
- Lans, H. and Hoeijmakers, J.H. (2006) Cell biology: ageing nucleus gets out of shape. *Nature*, **440**, 32-34.
- Lee, C., Chang, J.H., Lee, H.S. and Cho, Y. (2002a) Structural basis for the recognition of the E2F transactivation domain by the retinoblastoma tumor suppressor. *Genes Dev*, **16**, 3199-3212.
- Lee, K.K., Gruenbaum, Y., Spann, P., Liu, J. and Wilson, K.L. (2000) C. elegans nuclear envelope proteins emerin, MAN1, lamin, and nucleoporins reveal unique timing of nuclear envelope breakdown during mitosis. *Mol Biol Cell*, **11**, 3089-3099.
- Lee, K.K., Haraguchi, T., Lee, R.S., Koujin, T., Hiraoka, Y. and Wilson, K.L. (2001) Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *J Cell Sci*, **114**, 4567-4573.
- Lee, K.K., Starr, D., Cohen, M., Liu, J., Han, M., Wilson, K.L. and Gruenbaum, Y. (2002b) Lamin-dependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*, **13**, 892-901.
- Lehner, C.F., Stick, R., Eppenberger, H.M. and Nigg, E.A. (1987) Differential expression of nuclear lamin proteins during chicken development. *J Cell Biol*, **105**, 577-587.
- Lenz-Bohme, B., Wismar, J., Fuchs, S., Reifegerste, R., Buchner, E., Betz, H. and Schmitt, B. (1997) Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *J Cell Biol*, **137**, 1001-1016.
- Leung, G.K., Schmidt, W.K., Bergo, M.O., Gavino, B., Wong, D.H., Tam, A., Ashby, M.N., Michaelis, S. and Young, S.G. (2001) Biochemical studies of Zmpste24-deficient mice. *J Biol Chem*, **276**, 29051-29058.
- Libotte, T., Zaim, H., Abraham, S., Padmakumar, V.C., Schneider, M., Lu, W., Munck, M., Hutchison, C., Wehnert, M., Fahrenkrog, B., Sauder, U., Aebi, U., Noegel, A.A. and Karakesisoglou, I. (2005) Lamin A/C-dependent Localization of Nesprin-2, a Giant Scaffold at the Nuclear Envelope. *Mol Biol Cell*, **16**, 3411-3424.
- Lin, F., Blake, D.L., Callebaut, I., Skerjanc, I.S., Holmer, L., McBurney, M.W., Paulin-Levasseur, M. and Worman, H.J. (2000) MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem*, **275**, 4840-4847.
- Lin, F., Morrison, J.M., Wu, W. and Worman, H.J. (2005) MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Hum Mol Genet*, **14**, 437-445.
- Liu, B., Wang, J., Chan, K.M., Tjia, W.M., Deng, W., Guan, X., Huang, J.D., Li, K.M., Chau, P.Y., Chen, D.J., Pei, D., Pendas, A.M., Cadinanos, J., Lopez-Otin, C., Tse, H.F., Hutchison, C., Chen, J., Cao, Y., Cheah, K.S., Tryggvason, K. and Zhou, Z. (2005) Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med*, **11**, 780-785.
- Liu, J., Lee, K.K., Segura-Totten, M., Neufeld, E., Wilson, K.L. and Gruenbaum, Y. (2003) MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4598-4603.
- Liu, J., Rolef Ben-Shahar, T., Riemer, D., Treinin, M., Spann, P., Weber, K., Fire, A. and Gruenbaum, Y. (2000) Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in

- nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Mol Biol Cell*, **11**, 3937-3947.
- Lloyd, D.J., Trembath, R.C. and Shackleton, S. (2002) A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet*, **11**, 769-777.
- Luderus, M.E., de Graaf, A., Mattia, E., den Blaauwen, J.L., Grande, M.A., de Jong, L. and van Driel, R. (1992) Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell*, **70**, 949-959.
- Luderus, M.E., den Blaauwen, J.L., de Smit, O.J., Compton, D.A. and van Driel, R. (1994) Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol*, **14**, 6297-6305.
- Luo, K. (2004) Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 65-70.
- Maison, C., Pyrpassopoulou, A., Theodoropoulos, P.A. and Georgatos, S.D. (1997) The inner nuclear membrane protein LAP1 forms a native complex with B-type lamins and partitions with spindle-associated mitotic vesicles. *Embo J*, **16**, 4839-4850.
- Malone, C.J., Fixsen, W.D., Horvitz, H.R. and Han, M. (1999) UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during *C. elegans* development. *Development*, **126**, 3171-3181.
- Manilal, S., Nguyen, T.M., Sewry, C.A. and Morris, G.E. (1996) The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Hum Mol Genet*, **5**, 801-808.
- Mans, B.J., Anantharaman, V., Aravind, L. and Koonin, E.V. (2004) Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. *Cell Cycle*, **3**, 1612-1637.
- Mansharamani, M. and Wilson, K.L. (2005) Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin in vitro and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor. *J Biol Chem*, **280**, 13863-13870.
- Markiewicz, E., Dechat, T., Foisner, R., Quinlan, R.A. and Hutchison, C.J. (2002a) Lamin A/C binding protein LAP2alpha is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Mol Biol Cell*, **13**, 4401-4413.
- Markiewicz, E., Venables, R., Mauricio Alvarez, R., Quinlan, R., Dorobek, M., Hausmanowa-Petruciewicz, I. and Hutchison, C. (2002b) Increased solubility of lamins and redistribution of lamin C in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy fibroblasts. *J Struct Biol*, **140**, 241-253.
- Martin, L., Crimando, C. and Gerace, L. (1995) cDNA cloning and characterization of lamina-associated polypeptide 1C (LAP1C), an integral protein of the inner nuclear membrane. *J Biol Chem*, **270**, 8822-8828.
- Martins, S., Eikvar, S., Furukawa, K. and Collas, P. (2003) HA95 and LAP2 beta mediate a novel chromatin-nuclear envelope interaction implicated in initiation of DNA replication. *J Cell Biol*, **160**, 177-188.
- Martins, S.B., Eide, T., Steen, R.L., Jahnsen, T., Skalhegg, B.S. and Collas, P. (2000) HA95 is a protein of the chromatin and nuclear matrix regulating nuclear envelope dynamics. *J Cell Sci*, **113 Pt 21**, 3703-3713.
- Massague, J. and Wotton, D. (2000) Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J*, **19**, 1745-1754.
- McKeon, F.D., Kirschner, M.W. and Caput, D. (1986) Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature*, **319**, 463-468.
- Meier, J., Campbell, K.H., Ford, C.C., Stick, R. and Hutchison, C.J. (1991) The role of lamin LIII in nuclear assembly and DNA replication, in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J Cell Sci*, **98 (Pt 3)**, 271-279.

- Melcon, G., Kozlov, S., Cutler, D.A., Sullivan, T., Hernandez, L., Zhao, P., Mitchell, S., Nader, G., Bakay, M., Rottman, J.N., Hoffman, E.P. and Stewart, C.L. (2006) Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration. *Hum Mol Genet*, **15**, 637-651.
- Mislow, J.M., Holaska, J.M., Kim, M.S., Lee, K.K., Segura-Totten, M., Wilson, K.L. and McNally, E.M. (2002) Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett*, **525**, 135-140.
- Moir, R.D., Donaldson, A.D. and Stewart, M. (1991) Expression in Escherichia coli of human lamins A and C: influence of head and tail domains on assembly properties and paracrystal formation. *J Cell Sci*, **99** (Pt 2), 363-372.
- Moir, R.D., Montag-Lowy, M. and Goldman, R.D. (1994) Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol*, **125**, 1201-1212.
- Moir, R.D., Yoon, M., Khoun, S. and Goldman, R.D. (2000) Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *J. Cell Biol.*, **151**, 1155-1168.
- Mounkes, L., Kozlov, S., Burke, B. and Stewart, C.L. (2003a) The laminopathies: nuclear structure meets disease. *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 223-230.
- Mounkes, L.C., Burke, B. and Stewart, C.L. (2001) The A-type lamins: nuclear structural proteins as a focus for muscular dystrophy and cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med*, **11**, 280-285.
- Mounkes, L.C., Kozlov, S., Hernandez, L., Sullivan, T. and Stewart, C.L. (2003b) A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. *Nature*, **423**, 298-301.
- Muchir, A. (2000) Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1453-1459.
- Muchir, A., Bonne, G., van der Kooi, A.J., van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P.A., de Visser, M. and Schwartz, K. (2000) Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet*, **9**, 1453-1459.
- Nagano, A., Koga, R., Ogawa, M., Kurano, Y., Kawada, J., Okada, R., Hayashi, Y.K., Tsukahara, T. and Arahata, K. (1996) Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, **12**, 254-259.
- Newport, J.W., Wilson, K.L. and Dunphy, W.G. (1990) A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol*, **111**, 2247-2259.
- Nigg, E.A. (1992) Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. *Semin Cell Biol*, **3**, 245-253.
- Nili, E., Cojocaru, G.S., Kalma, Y., Ginsberg, D., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Berger, R., Shaklai, S., Amariglio, N., Brok-Simoni, F., Simon, A.J. and Rechavi, G. (2001) Nuclear membrane protein LAP2beta mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ-cell-less). *J Cell Sci*, **114**, 3297-3307.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. and Yura, T. (1998) Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 1694-1699.
- Osada, S., Ohmori, S.Y. and Taira, M. (2003) XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in Xenopus embryos. *Development*, **130**, 1783-1794.

- Ostlund, C., Ellenberg, J., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J. and Worman, H.J. (1999) Intracellular trafficking of emerin, the Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein. *J Cell Sci*, **112** (Pt 11), 1709-1719.
- Ozaki, T., Saijo, M., Murakami, K., Enomoto, H., Taya, Y. and Sakiyama, S. (1994) Complex formation between lamin A and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin A required for its interaction. *Oncogene*, **9**, 2649-2653.
- Pan, D., Estevez-Salmeron, L.D., Stroschein, S.L., Zhu, X., He, J., Zhou, S. and Luo, K. (2005) The integral inner nuclear membrane protein MAN1 physically interacts with the R-Smad proteins to repress signaling by the transforming growth factor- β superfamily of cytokines. *J Biol Chem*, **280**, 15992-16001.
- Parraga, A., Bellolell, L., Ferre-D'Amare, A.R. and Burley, S.K. (1998) Co-crystal structure of sterol regulatory element binding protein 1a at 2.3 Å resolution. *Structure*, **6**, 661-672.
- Paulin-Levasseur, M., Blake, D.L., Julien, M. and Rouleau, L. (1996) The MAN antigens are non-lamin constituents of the nuclear lamina in vertebrate cells. *Chromosoma*, **104**, 367-379.
- Pendas, A.M., Zhou, Z., Cadinanos, J., Freije, J.M., Wang, J., Hultenby, K., Astudillo, A., Wernerson, A., Rodriguez, F., Tryggvason, K. and Lopez-Otin, C. (2002) Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet*, **31**, 94-99.
- Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J.C. and Nigg, E.A. (1990) In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*, **61**, 591-602.
- Quinlan, R., Hutchison, C. and Lane, B. (1995) Intermediate filament proteins. *Protein Profile*, **2**, 795-952.
- Rabut, G., Lenart, P. and Ellenberg, J. (2004) Dynamics of nuclear pore complex organization through the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 314-321.
- Raju, G.P., Dimova, N., Klein, P.S. and Huang, H.C. (2003) SANE, a novel LEM domain protein, regulates bone morphogenetic protein signaling through interaction with Smad1. *J Biol Chem*, **278**, 428-437.
- Reed, R. and Hurt, E. (2002) A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell*, **108**, 523-531.
- Reitman, M.L., Arioglu, E., Gavrilova, O. and Taylor, S.I. (2000) Lipodystrophy revisited. *Trends Endocrinol Metab*, **11**, 410-416.
- Riemer, D., Karabinos, A. and Weber, K. (1998) Analysis of eight cDNAs and six genes for intermediate filament protein in the cephalochordate Brachiostoma reveals differences in the multigene families of lower chordates and the vertebrates. *Gene*, **211**, 361-373.
- Rosenkranz, S. (2004) TGF- β 1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*, **63**, 423-432.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. and Chait, B.T. (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol*, **148**, 635-651.
- Sakaki, M., Koike, H., Takahashi, N., Sasagawa, N., Tomioka, S., Arahata, K. and Ishiura, S. (2001) Interaction between emerin and nuclear lamins. *J Biochem (Tokyo)*, **129**, 321-327.
- Sasseville, A.M. and Langelier, Y. (1998) In vitro interaction of the carboxy-terminal domain of lamin A with actin. *FEBS Lett*, **425**, 485-489.
- Sasseville, A.M. and Raymond, Y. (1995) Lamin A precursor is localized to intranuclear foci. *J Cell Sci*, **108** (Pt 1), 273-285.
- Scaffidi, P. and Misteli, T. (2006) Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*, **312**, 1059-1063.

- Scheer, U., Kartenbeck, J., Trendelenburg, M.F., Stadler, J. and Franke, W.W. (1976) Experimental disintegration of the nuclear envelope. Evidence for pore-connecting fibrils. *J Cell Biol*, **69**, 1-18.
- Schirmer, E., Guam, T. and Gerace, L. (2001) Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interactions important for nuclear organization. *J. Cell Biol.*, **153**, 479-489.
- Schirmer, E.C., Florens, L., Guan, T., Yates, J.R., 3rd and Gerace, L. (2003) Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science*, **301**, 1380-1382.
- Schirmer, E.C. and Gerace, L. (2004) The stability of the nuclear lamina polymer changes with the composition of lamin subtypes according to their individual binding strengths. *J Biol Chem*, **279**, 42811-42817.
- Schuler, E., Lin, F. and Worman, H.J. (1994) Characterization of the human gene encoding LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem*, **269**, 11312-11317.
- Segura-Totten, M. and Wilson, K.L. (2004) BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol*, **14**, 261-266.
- Selenko, P., Gregorovic, G., Sprangers, R., Stier, G., Rhani, Z., Kramer, A. and Sattler, M. (2003) Structural basis for the molecular recognition between human splicing factors U2AF65 and SF1/mBBP. *Mol Cell*, **11**, 965-976.
- Sevenants, L., Wouters, C., De Sandre-Giovannoli, A., Devlieger, H., Devriendt, K., van den Oord, J.J., Marien, K., Levy, N. and Morren, M.A. (2005) Tight skin and limited joint movements as early presentation of Hutchinson-Gilford progeria in a 7-week-old infant. *Eur J Pediatr*, **164**, 283-286.
- Shackleton, S., Lloyd, D.J., Jackson, S.N., Evans, R., Niermeijer, M.F., Singh, B.M., Schmidt, H., Brabant, G., Kumar, S., Durrington, P.N., Gregory, S., O'Rahilly, S. and Trembath, R.C. (2000) LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet*, **24**, 153-156.
- Shelton, K.R., Guthrie, V.H. and Cochran, D.L. (1982) Oligomeric structure of the major nuclear envelope protein lamin B. *J Biol Chem*, **257**, 4328-4332.
- Shi, Y. and Massague, J. (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, **113**, 685-700.
- Silve, S., Dupuy, P.H., Ferrara, P. and Loison, G. (1998) Human lamin B receptor exhibits sterol C14-reductase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1392**, 233-244.
- Simos, G., Maison, C. and Georgatos, S.D. (1996) Characterization of p18, a component of the lamin B receptor complex and a new integral membrane protein of the avian erythrocyte nuclear envelope. *J Biol Chem*, **271**, 12617-12625.
- Smythe, C., Jenkins, H.E. and Hutchison, C.J. (2000) Incorporation of the nuclear pore basket protein nup153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Embo J*, **19**, 3918-3931.
- Somech, R., Shaklai, S., Amariglio, N., Rechavi, G. and Simon, A.J. (2005) Nuclear envelopathies--raising the nuclear veil. *Pediatr Res*, **57**, 8R-15R.
- Soullam, B. and Worman, H.J. (1993) The amino-terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal. *J Cell Biol*, **120**, 1093-1100.
- Soullam, B. and Worman, H.J. (1995) Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol*, **130**, 15-27.
- Spann, T.P., Goldman, A.E., Wang, C., Huang, S. and Goldman, R.D. (2002) Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol*, **156**, 603-608.

- Spann, T.P., Moir, R.D., Goldman, A.E., Stick, R. and Goldman, R.D. (1997) Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol*, **136**, 1201-1212.
- Speckman, R.A., Garg, A., Du, F., Bennett, L., Veile, R., Arioglu, E., Taylor, S.I., Lovett, M. and Bowcock, A.M. (2000) Mutational and haplotype analyses of families with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) reveal recurrent missense mutations in the globular C-terminal domain of lamin A/C. *Am J Hum Genet*, **66**, 1192-1198.
- Starr, D.A. and Fischer, J.A. (2005) KASH 'n Karry: the KASH domain family of cargo-specific cytoskeletal adaptor proteins. *Bioessays*, **27**, 1136-1146.
- Starr, D.A. and Han, M. (2002) Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science*, **298**, 406-409.
- Starr, D.A. and Han, M. (2003) ANChors away: an actin based mechanism of nuclear positioning. *J Cell Sci*, **116**, 211-216.
- Stewart, C. and Burke, B. (1987) Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell*, **51**, 383-392.
- Stick, R. (1988) cDNA cloning of the developmentally regulated lamin LIII of *Xenopus laevis*. *Embo J*, **7**, 3189-3197.
- Stick, R. and Hausen, P. (1985) Changes in the nuclear lamina composition during early development of *Xenopus laevis*. *Cell*, **41**, 191-200.
- Stierle, V., Couprie, J., Ostlund, C., Krimm, I., Zinn-Justin, S., Hossenlopp, P., Worman, H.J., Courvalin, J.C. and Duband-Goulet, I. (2003) The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry*, **42**, 4819-4828.
- Strelkov, S.V., Herrmann, H., Geisler, N., Lustig, A., Ivaninskii, S., Zimbelmann, R., Burkhard, P. and Aebi, U. (2001) Divide-and-conquer crystallographic approach towards an atomic structure of intermediate filaments. *J Mol Biol*, **306**, 773-781.
- Strelkov, S.V., Schumacher, J., Burkhard, P., Aebi, U. and Herrmann, H. (2004) Crystal structure of the human lamin A coil 2B dimer: implications for the head-to-tail association of nuclear lamins. *J Mol Biol*, **343**, 1067-1080.
- Stura, E.A., Satterthwait, A.C., Calvo, J.C., Kaslow, D.C. and Wilson, I.A. (1994) Reverse screening. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **50**, 448-455.
- Stuurman, N., Heins, S. and Aebi, U. (1998) Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol*, **122**, 42-66.
- Stuurman, N., Sasse, B. and Fisher, P.A. (1996) Intermediate filament protein polymerization: molecular analysis of *Drosophila* nuclear lamin head-to-tail binding. *J Struct Biol*, **117**, 1-15.
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C.L. and Burke, B. (1999) Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol*, **147**, 913-920.
- Suntharalingam, M. and Wente, S.R. (2003) Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev Cell*, **4**, 775-789.
- Takano, M., Takeuchi, M., Ito, H., Furukawa, K., Sugimoto, K., Omata, S. and Horigome, T. (2002) The binding of lamin B receptor to chromatin is regulated by phosphorylation in the RS region. *Eur J Biochem*, **269**, 943-953.
- Taniura, H., Glass, C. and Gerace, L. (1995) A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J Cell Biol*, **131**, 33-44.
- Taylor, M.R., Slavov, D., Gajewski, A., Vlcek, S., Ku, L., Fain, P.R., Carniel, E., Di Lenarda, A., Sinagra, G., Boucek, M.M., Cavanaugh, J., Graw, S.L., Ruegg, P., Feiger, J., Zhu, X., Ferguson, D.A., Bristow, M.R., Gotzmann, J., Foisner, R. and Mestroni, L. (2005) Thymopoietin (lamina-associated polypeptide 2) gene mutation associated with dilated cardiomyopathy. *Hum Mutat*.

- Tontonoz, P., Kim, J.B., Graves, R.A. and Spiegelman, B.M. (1993) ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol*, **13**, 4753-4759.
- Tsukahara, T., Tsujino, S. and Arahata, K. (2002) CDNA microarray analysis of gene expression in fibroblasts of patients with X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, **25**, 898-901.
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L. and Wrana, J.L. (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*, **95**, 779-791.
- Van Berlo, J.H., Voncken, J.W., Kubben, N., Broers, J.L., Duisters, R., van Leeuwen, R.E., Crijns, H.J., Ramaekers, F.C., Hutchison, C.J. and Pinto, Y.M. (2005) A-type lamins are essential for TGF-beta1 induced PP2A to dephosphorylate transcription factors. *Hum Mol Genet*, **14**, 2839-2849.
- van Engelen, B.G., Muchir, A., Hutchison, C.J., van der Kooi, A.J., Bonne, G. and Lammens, M. (2005) The lethal phenotype of a homozygous nonsense mutation in the lamin A/C gene. *Neurology*, **64**, 374-376.
- Vantyghem, M.C., Pigny, P., Maurage, C.A., Rouaix-Emery, N., Stojkovic, T., Cuisset, J.M., Millaire, A., Lascols, O., Vermersch, P., Wemeau, J.L., Capeau, J. and Vigouroux, C. (2004) Patients with familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type due to a LMNA R482W mutation show muscular and cardiac abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 5337-5346.
- Vaughan, A., Alvarez-Reyes, M., Bridger, J.M., Broers, J.L., Ramaekers, F.C., Wehnert, M., Morris, G.E., Whitfield, W.G.F. and Hutchison, C.J. (2001) Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J Cell Sci*, **114**, 2577-2590.
- Verstraeten, V.L.R.M., Broers, J.L.V., van Steensel, M.A.M., Zinn-Justin, S., Ramaekers, F.C.S., Steijlen, P.M., Kamps, M., Kuijpers, H.J.H., Merckx, D., Smeets, H.J.M., Hennekam, R.C.M., Marcelis, C.L.M. and van den Wijngaard, A. (2006) Compound heterozygosity for mutations in LMNA causes a progeria syndrome without prelamin A accumulation. *Human Molecular Genetic*, in Press
- Vigouroux, C., Auclair, M., Dubosclard, E., Pouchelet, M., Capeau, J., Courvalin, J.C. and Buendia, B. (2001) Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J Cell Sci*, **114**, 4459-4468.
- Vigouroux, C., Magre, J., Vantyghem, M.C., Bourut, C., Lascols, O., Shackleton, S., Lloyd, D.J., Guerci, B., Padova, G., Valensi, P., Grimaldi, A., Piquemal, R., Touraine, P., Trembath, R.C. and Capeau, J. (2000) Lamin A/C gene: sex-determined expression of mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy and absence of coding mutations in congenital and acquired generalized lipoatrophy. *Diabetes*, **49**, 1958-1962.
- Vlcek, S., Dechat, T. and Foisner, R. (2001) Nuclear envelope and nuclear matrix: interactions and dynamics. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 1758-1765.
- Vlcek, S., Just, H., Dechat, T. and Foisner, R. (1999) Functional diversity of LAP2alpha and LAP2beta in postmitotic chromosome association is caused by an alpha-specific nuclear targeting domain. *Embo J*, **18**, 6370-6384.
- Vorburger, K., Kitten, G.T. and Nigg, E.A. (1989) Modification of nuclear lamin proteins by a mevalonic acid derivative occurs in reticulocyte lysates and requires the cysteine residue of the C-terminal CXXM motif. *Embo J*, **8**, 4007-4013.
- Wagner, N., Schmitt, J. and Krohne, G. (2004) Two novel LEM-domain proteins are splice products of the annotated *Drosophila melanogaster* gene CG9424 (Bocksbeutel). *Eur J Cell Biol*, **82**, 605-616.

- Walter, M.C., Witt, T.N., Weigel, B.S., Reilich, P., Richard, P., Pongratz, D., Bonne, G., Wehnert, M.S. and Lochmuller, H. (2005) Deletion of the LMNA initiator codon leading to a neurogenic variant of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, **15**, 40-44.
- Ward, G.E. and Kirschner, M.W. (1990) Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell*, **61**, 561-577.
- Warren, D.T., Zhang, Q., Weissberg, P.L. and Shanahan, C.M. (2005) Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function? *Expert Rev Mol Med*, **7**, 1-15.
- Waterham, H.R., Koster, J., Mooyer, P., Noort Gv, G., Kelley, R.I., Wilcox, W.R., Wanders, R.J., Hennekam, R.C. and Oosterwijk, J.C. (2003) Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *Am J Hum Genet*, **72**, 1013-1017.
- Wildermuth, S., Spranger, S., Spranger, M., Raue, F. and Meinck, H.M. (1996) Kobberling-Dunnigan syndrome: a rare cause of generalized muscular hypertrophy. *Muscle Nerve*, **19**, 843-847.
- Wilkinson, F.L., Holaska, J.M., Zhang, Z., Sharma, A., Manilal, S., Holt, I., Stamm, S., Wilson, K.L. and Morris, G.E. (2003) Emerin interacts in vitro with the splicing-associated factor, YT521-B. *Eur J Biochem*, **270**, 2459-2466.
- Wills, E.A., Roberts, I.S., Del Poeta, M., Rivera, J., Casadevall, A., Cox, G.M. and Perfect, J.R. (2001) Identification and characterization of the *Cryptococcus neoformans* phosphomannose isomerase-encoding gene, MAN1, and its impact on pathogenicity. *Mol Microbiol*, **40**, 610-620.
- Wolff, N., Gilquin, B., Courchay, K., Callebaut, I., Worman, H.J. and Zinn-Justin, S. (2001) Structural analysis of emerin, an inner nuclear membrane protein mutated in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *FEBS Lett*, **501**, 171-176.
- Worman, H.J. (2006) Inner nuclear membrane and regulation of Smad-mediated signaling. *Biochim Biophys Acta*.
- Worman, H.J., Evans, C.D. and Blobel, G. (1990) The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *J Cell Biol*, **111**, 1535-1542.
- Worman, H.J., Yuan, J., Blobel, G. and Georgatos, S.D. (1988) A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8531-8534.
- Wu, G., Chen, Y.G., Ozdamar, B., Gyuricza, C.A., Chong, P.A., Wrana, J.L., Massague, J. and Shi, Y. (2000) Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science*, **287**, 92-97.
- Wu, J.W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D.J., Kyin, S., Muir, T.W., Fairman, R., Massague, J. and Shi, Y. (2001) Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol Cell*, **8**, 1277-1289.
- Wu, W., Lin, F. and Worman, H.J. (2002) Intracellular trafficking of MAN1, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J Cell Sci*, **115**, 1361-1371.
- Wydner, K.L., McNeil, J.A., Lin, F., Worman, H.J. and Lawrence, J.B. (1996) Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, **32**, 474-478.
- Yang, L., Guan, T. and Gerace, L. (1997) Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *J Cell Biol*, **137**, 1199-1210.
- Ye, Q., Callebaut, I., Pezhman, A., Courvalin, J.C. and Worman, H.J. (1997) Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J Biol Chem*, **272**, 14983-14989.

- Ye, Q. and Worman, H.J. (1994) Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem*, **269**, 11306-11311.
- Ye, Q. and Worman, H.J. (1995) Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp Cell Res*, **219**, 292-298.
- Ye, Q. and Worman, H.J. (1996) Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to *Drosophila* HP1. *J Biol Chem*, **271**, 14653-14656.
- Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M.R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*, **75**, 187-197.
- Young, K.G. and Kothary, R. (2005) Spectrin repeat proteins in the nucleus. *Bioessays*, **27**, 144-152.
- Zastrow, M.S., Flaherty, D.B., Benian, G.M. and Wilson, K.L. (2006) Nuclear titin interacts with A- and B-type lamins in vitro and in vivo. *J Cell Sci*, **119**, 239-249.
- Zastrow, M.S., Vlcek, S. and Wilson, K.L. (2004) Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J Cell Sci*, **117**, 979-987.
- Zhang, C., Jenkins, H., Goldberg, M.W., Allen, T.D. and Hutchison, C.J. (1996) Nuclear lamina and nuclear matrix organization in sperm pronuclei assembled in *Xenopus* egg extract. *J Cell Sci*, **109** (Pt 9), 2275-2286.
- Zhang, Q., Ragnauth, C., Greener, M.J., Shanahan, C.M. and Roberts, R.G. (2002) The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300. *Genomics*, **80**, 473-481.
- Zhang, Q., Ragnauth, C.D., Skepper, J.N., Worth, N.F., Warren, D.T., Roberts, R.G., Weissberg, P.L., Ellis, J.A. and Shanahan, C.M. (2005) Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *J Cell Sci*, **118**, 673-687.
- Zhang, Q., Skepper, J.N., Yang, F., Davies, J.D., Hegyi, L., Roberts, R.G., Weissberg, P.L., Ellis, J.A. and Shanahan, C.M. (2001) Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J Cell Sci*, **114**, 4485-4498.